



Fakultät für Medizin

In-vitro-Untersuchung der Biokompatibilität additiv gefertigter Biomaterialien  
zur knöchernen Rekonstruktion im Gesichtsbereich

Katharina Ivanka Gabriela Pippich

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Zahnheilkunde  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Herbert Deppe

Prüfende der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Dr. Andreas Fichter
2. Priv.-Doz. Dr. Markus Wirth

Die Dissertation wurde am 24.08.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 04.01.2022 angenommen.

meinen Eltern

## INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung .....	4
2. Material und Methoden .....	8
2.1 Biomaterialien .....	8
2.2 Zellkultur .....	10
2.3 Besiedelung der Biomaterialien und Kultivierung .....	11
2.4 Proliferations Assay .....	11
2.5 Apoptose Assay .....	12
2.6 Zytotoxizitäts Assay .....	14
2.7 Sulforhodamin B Assay .....	14
2.8 Fluoreszenzmikroskopie .....	15
2.9 Rasterelektronenmikroskopie .....	16
2.10 Statistische Analyse .....	18
3. Ergebnisse .....	19
3.1 Proliferations Assay .....	19
3.2 Apoptose Assay .....	22
3.3 Zytotoxizitäts Assay .....	24
3.4 Sulforhodamin B Assay .....	25
3.5 Fluoreszenzmikroskopie .....	28
3.6 Rasterelektronenmikroskopie .....	30
4. Diskussion .....	38
Zusammenfassung und Schlussfolgerung .....	45
Abstract .....	47
Literaturverzeichnis .....	48
Abbildungsverzeichnis .....	55
Tabellenverzeichnis .....	59
Abkürzungsverzeichnis .....	60
Publikation .....	62
Danksagung .....	63

## 1. Einleitung

Im Rahmen von Tumorresektionen, Knochenentzündungen, Fehlbildungen oder Traumata kommt es häufig zu Knochendefekten (Wolff et al., 2012). Diese erfordern eine entsprechende Versorgung, um eine möglichst vollständige Wiederherstellung zu erreichen. In der rekonstruktiven Chirurgie lassen sich diesbezüglich autogene, allogene, xenogene und alloplastische Knochenersatzmaterialien unterscheiden.

Den Goldstandard für die Rekonstruktion von ossären Defekten stellt nach wie vor die körpereigene, autogene Knochentransplantation dar (Linhart et al., 2000). Die Versorgung von Knochendefekten mit körpereigenem Knochen wurde bereits vor mehreren Jahrhunderten beschrieben (Yaszemski et al., 1996). Bei der autogenen Knochentransplantation ist die Knochenverfügbarkeit jedoch begrenzt. Auch entsteht dadurch ein zweites Operationsgebiet, in dem es zu einer nicht unerheblichen Hebedefektmorbidität kommen kann. Dazu zählen Wundheilungsstörungen, Schmerzen, Funktionseinschränkung, Vernarbung, Nekrosen oder ein kosmetisch unerwünschtes Ergebnis (Linhart et al., 2000, Wolff et al., 2011). Aus diesem Grund nimmt die Forschung auf dem Gebiet der Knochenregeneration ständig zu (Habibovic und De Groot, 2007).

Bei der allogenen Knochentransplantation wird fremdes menschliches Knochengewebe verwendet, das in gefrorener oder gefriergetrockneter devitalisierter Form vorliegt (Misch und Dietsch, 1993). Trotz Vorbehandlung kann es in seltenen Fällen zu einer Übertragung von Krankheitserregern vom Spender auf den Empfänger oder zu Allergisierungen kommen (Simonds et al., 1992).

Xenogene Materialien stammen von einer anderen Spezies als dem Menschen ab und werden durch Deproteinierung aus tierischem Knochen hergestellt. Auch hier kann eine Übertragung von Krankheitserregern nicht komplett ausgeschlossen werden.

Von großem Interesse sind deshalb alloplastische, also vollsynthetisch hergestellte Biomaterialien. Diese können als Knochenersatzmaterial keine Komplikationen an der Entnahmestelle hervorrufen und stellen durch eine geeignete Architektur eine Alternative zur autogenen Knochentransplantation dar (Burg et al., 2000, Al Ruhaimi, 2001, Gomez et al., 2016). Ein weiterer Vorteil synthetisch hergestellter Biomaterialien ist die Möglichkeit der computergesteuerten individuellen Planung und Konstruktion von Implantatform und -größe. So können die Materialien individuell entsprechend des zu versorgenden Knochendefekts dimensioniert werden, was bei anderen Versorgungsmöglichkeiten wie der autogenen Knochentransplantation nicht möglich ist. Darüber hinaus ergeben sich bei alloplastischen Materialien im Gegensatz zum autologen Knochen keine Limitationen hinsichtlich Menge und Knochenverfügbarkeit.

Das klinische Outcome erfordert verbesserte mechanische und biologische Eigenschaften der Knochenersatzmaterialien. Ein ideales Biomaterial wird nach der Einheilungszeit durch regenerierten neuen Knochen ersetzt. Bei den alloplastischen Materialien unterscheidet man zwischen resorbierbaren und nicht resorbierbaren Materialien. Viele gängige synthetische Materialien wie beispielsweise Silikon oder Polyetheretherketon (PEEK) sind nicht resorbierbar, verbleiben dauerhaft im Körper und besitzen körperfremde Eigenschaften. Resorbierbare Materialien werden vom Körper abgebaut, so kann dort eigener Knochen entstehen. Ein Gerüst, das als Leitschiene dient, kann dabei die Gewebeneubildung fördern. Durch Einbeziehung in den natürlichen Knochenstoffwechsel wird es knöchern integriert und von eigenem Knochen durchwachsen. Das Implantat wird im Zeitverlauf resorbiert und muss deshalb nicht in einem zweiten Eingriff entfernt werden.

Zudem zeichnet sich das optimale Knochenersatzmaterial durch Biokompatibilität, also die Verträglichkeit für den menschlichen Organismus, aus. Biokompatibilität wird nach Williams definiert als die Fähigkeit eines Biomaterials, seine gewünschte Funktion zu erfüllen ohne unerwünschte Wirkungen hervorzurufen, die vorteilhafteste Zell- oder Gewebereaktion für diese spezifische Situation zu erzeugen und die klinisch relevante Leistung der Therapie zu optimieren (Williams, 2008). Schenk definierte für Knochenimplantate darüber hinaus die Kompatibilitätsgrade bioinert, bioaktiv, induktiv und konduktiv. Bioinerte Materialien setzen keine toxischen Substanzen frei, während bioaktive Werkstoffe zu einer Gewebedifferenzierung und Adhäsion von Knochen entlang des Werkstoffes führen. Induktive Stoffe führen laut Definition zu einer Induktion von heterotoper Knochenbildung. Ein osteokonduktives Material bietet ein Gerüst für neuen Knochenanbau, wenn ortständige Osteoblasten bereits vorhanden sind (Schenk, 1986). Eine poröse Architektur ermöglicht die Osteokonduktion mit Knochenneubildung im Material-Inneren schon vor vollständigem Abbau eines Materials durch ein geeignetes Porensystem. Hinsichtlich Architektur und chemischer Zusammensetzung sollte idealerweise die extrazelluläre Knochenmatrix (ECM) nachgeahmt werden, damit Zellen adhären, sich vermehren und differenzieren können (Jensen et al., 2006, Navarro, 2008).

Sehr häufig verwendete Biomaterialien sind Keramiken wie  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP) oder Hydroxylapatit (HA). Aufgrund ihrer Osteokonduktivität und Ähnlichkeit mit der Zusammensetzung von Knochen spielen sie beim Tissue-Engineering eine entscheidende Rolle. Insbesondere  $\beta$ -TCP besitzt eine hohe Löslichkeit, wird so schneller abgebaut und macht dadurch den Ersatz durch neuen regenerierten Knochen möglich (Barrère, 2006, Kamitakahara, 2008, Banerjee et al., 2010).

Polymere wie Poly-L-lactid acid (PLLA) oder Poly-D,L-lactid acid (PDLLA) haben sich ebenfalls in zahlreichen Studien als vielversprechend herausgestellt. Ihre Biokompatibilität

und biologische Abbaubarkeit machen sie für die Regeneration von Knochengewebe geeignet. Sie weisen ausreichend mechanische Stabilität auf und ihr Elastizitätsmodul kommt dem der natürlichen Kortikalis näher als sprödere keramische Werkstoffe (Piskin, 2002, Zhu et al., 2013).

Auch Komposit-Scaffolds aus Polymer und Keramik sind beim Knochen Tissue Engineering häufig verwendete Biomaterialien und werden derzeit klinisch untersucht. Um gute Biokompatibilität und Stabilität zu erreichen, werden Keramik- und Polymeranteile kombiniert (Daculsi et al., 2011, Johnson, 2011, Delabarde et al., 2012, Perez, 2013, Lee et al., 2013, Liu, 2013). Ebenso wird mit Calciumcarbonat (CC) oder Magnesium (Mg) versetztes PDLLA oder PLLA als Erfolg versprechend bewertet (Gayer et al., 2019, Bakhsheshi-Rad et al., 2020).

Frühere Studien haben gezeigt, dass bestimmte definierte Parameter wie Porosität, Porengröße und Porenform neben mechanischen Eigenschaften ausschlaggebend für die Zelladhäsion und das Einwachsen von Knochen sind (Indolfi et al., 2012, Shalumon et al., 2012). Durch die dreidimensionale Konstruktion eines bezüglich dieser Parameter optimalen Scaffolds kann der Knochenstoffwechsel gezielt positiv beeinflusst werden. Mit herkömmlichen Produktionstechniken kann diese komplexe Konstruktion aber nur schwer umgesetzt werden, da Parameter wie Porengröße, Porosität und Porenverteilung nicht exakt gesteuert werden können (Butscher et al., 2011). In dieser Studie wurden Materialien näher untersucht, die alle im Reinraum mit standardisierten Techniken additiv fertigbar sind. Beim additiven Fertigungsverfahren wird computergesteuert durch schichtweisen Aufbau ein dreidimensionales Konstrukt hergestellt. Dies bietet den Vorteil, dass definierte Konstruktionsparameter für verschiedenste Materialien exakt umgesetzt werden können.

Die meisten Studien beschreiben nur eine Materialgruppe, daher war bisher die Vergleichbarkeit der Materialien untereinander eingeschränkt. In dieser Studie wurden acht verschiedene Materialgruppen durch die Kombination neuer Technologien der additiven Fertigung wie Digital-Light-Processing (DLP), Selective-Laser-Sintering (SLS) und Fused-Deposition-Modeling (FDM) hergestellt. Sowohl die jeweiligen Prozesse als auch die Porenstrukturen wurden entsprechend optimiert, um vergleichbare Scaffolds auf allen Technologien herstellen zu können. So ist es möglich ein breites Spektrum an Materialien und Material-Kombinationen objektiv zu vergleichen.

Folgende resorbierbare Biomaterialien wurden in der vorliegenden Arbeit bezüglich ihrer Biokompatibilität mit der gleichen Methodik untersucht: Poly-L-lactid acid-Calciumcarbonat (PLLA-CC), Poly-L-lactid acid-Tricalciumphosphat (PLLA-TCP), Poly-L-lactid acid-Polyglycolic acid-Calciumcarbonat (PLLA-PGA-CC), Poly-D,L-lactid acid-Magnesium

(PDLLA-Mg), Poly-D,L-lactid acid (PDLLA),  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit ( $\beta$ -TCP-HA) und  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP und  $\beta$ -TCP').

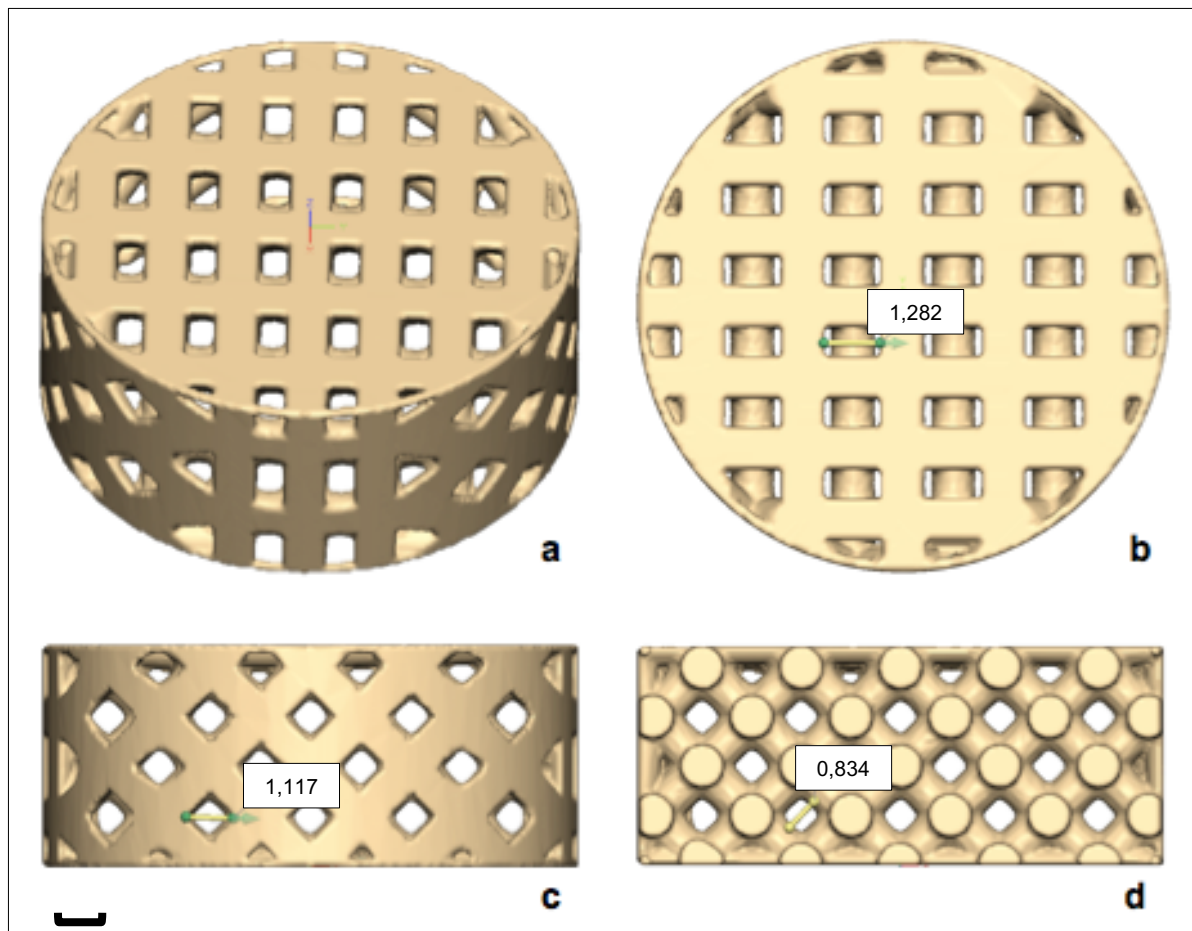
Die Konstrukte wurden mit humanen Knochenzellen besiedelt und 21 Tage lang in-vitro kultiviert. Proliferationsverhalten und Apoptoseaktivität der Osteoblasten wurden evaluiert, um das Zellwachstum auf den jeweiligen Materialien beurteilen und vergleichen zu können. Das Zellwachstum wurde darüber hinaus fluoreszenz- sowie rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Zudem wurde die Zellproliferation bei indirektem Materialkontakt bestimmt und ein Zytotoxizitäts Assay als weiterer Parameter für die Biokompatibilitätsprüfung der Materialien verwendet.

In-vitro-Untersuchungen stellen in der Regel die erste Stufe im Testverfahren zur Biokompatibilitätsprüfung dar. Als nächster Schritt ist die Anwendung im Tierversuch geplant, um die vielversprechendsten Materialien auf ihre Eignung für die klinische Anwendung zu untersuchen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Biomaterialien

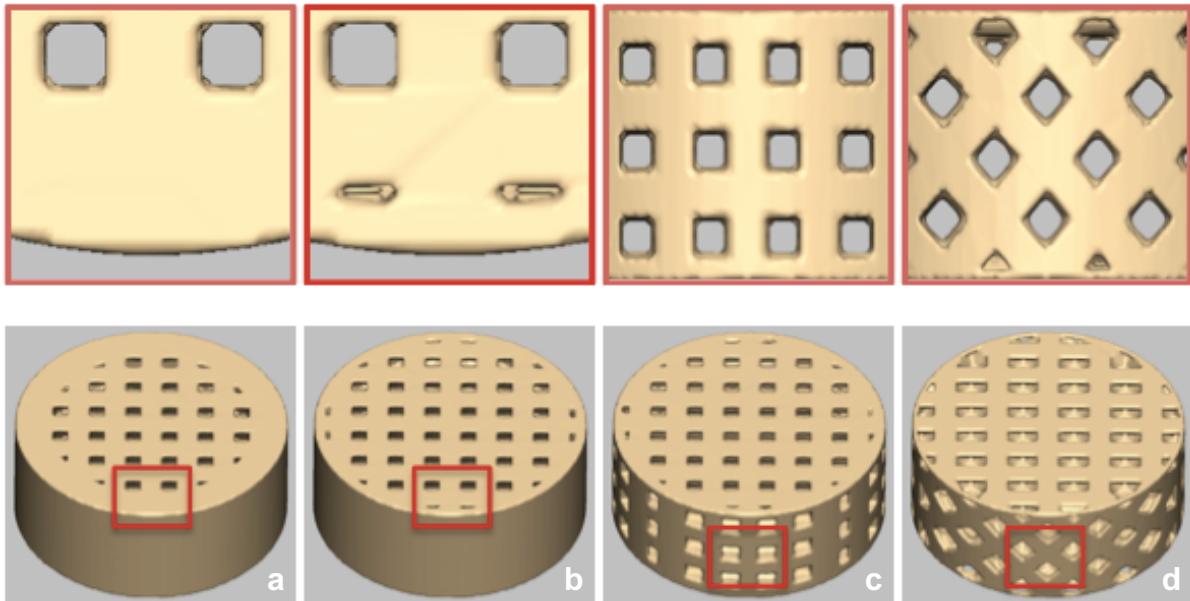
Die Scaffolds wurden in Zusammenarbeit mit dem Medizintechnikunternehmen Karl Leibinger Medizintechnik GmbH & Co. KG in Mühlheim an der Donau unter Reinraumbedingungen hergestellt, verpackt und anschließend Gamma-sterilisiert. Die Scaffolds wurden mit einem Durchmesser von 12 mm und eine Höhe von 5 mm konstruiert (Abbildung 1).



**Abbildung 1.** Scaffoldaufbau. a: Dreidimensionale Ansicht, b: Draufsicht, c: Seitansicht, d: Querschnitt (Größen in mm). Maßstabsleiste = 1 mm.

Um vergleichbare Scaffolds zu erhalten, wurde im ersten Schritt die Wandung reduziert. Nach einer Optimierung der Prozessparameter konnte in einer zweiten Optimierung die Wandstärke entfernt, und somit auch die Randstruktur für Flüssigkeiten und Zellen permeabel gemacht werden. Um eine höhere Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der verschiedenen Fertigungsmethoden zu erhalten, wurde in einem letzten Schritt die Porengeometrie vergrößert und gedreht (Abbildung 2).



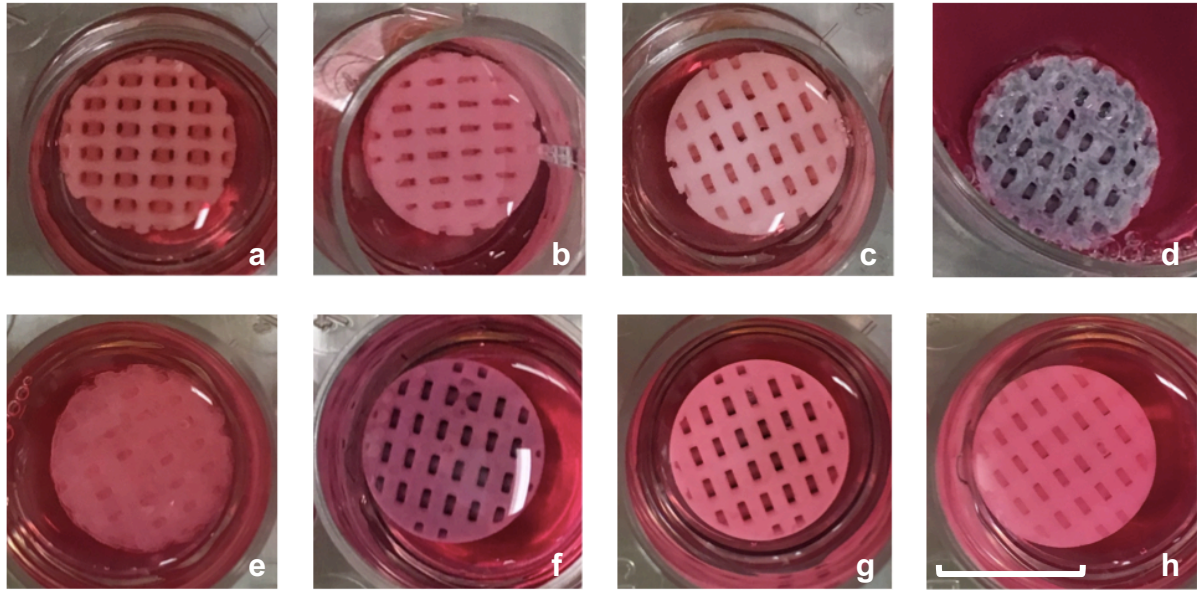


**Abbildung 2.** Scaffoldfertigung. a: Ausgangszustand, b: Reduktion der Wandung, c: Entfernung der Wandstärke, d: Vergrößerung und Drehung der Porengeometrie.

Die Scaffolds aus PLLA-CC wurden mittels Selective-Laser-Sintering (SLS) Technologie auf der EOS P110, Fa. EOS GmbH, Krailling bei München, Deutschland, hergestellt. Bei der SLS Technologie wird das Scaffold aus einem pulverförmigen Ausgangsstoff Schicht für Schicht aufgebaut. Mittels Laser werden die Pulverpartikel der einzelnen Schichten miteinander verschmolzen.

Die Scaffolds aus PLLA-TCP, PLLA-PGA-CC, PDLLA-Mg und PDLLA wurden mittels der Fused-Deposition-Modeling (FDM) Technologie auf der Arburg AKF, Fa. Arburg GmbH + Co. KG, Loßburg, Deutschland, hergestellt. Beim FDM Verfahren werden die Scaffolds aus schmelzfähigen Materialien aufgebaut, die schichtweise aufgebracht werden und durch Abkühlung an der gewünschten Stelle erhärten.

Die Scaffolds aus  $\beta$ -TCP-HA und  $\beta$ -TCP wurden auf der CeraFab7500, Lithoz GmbH, Wien, Österreich, mittels Digital-Light-Processing (DLP) Technologie hergestellt, bei der die Scaffolds aufgebaut werden, indem Keramikpulver Schicht für Schicht mit einer Lichtquelle verschmolzen wird. Bei den  $\beta$ -TCP-HA Implantaten erfolgte die anschließende Sinterung zwischen 1150 – 1300 °C, beim  $\beta$ -TCP zwischen 1050 – 1200 °C. Aus  $\beta$ -TCP wurden zwei Scaffoldtypen mit unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften gefertigt ( $\beta$ -TCP und  $\beta$ -TCP'). Zur besseren Unterscheidung der Materialien  $\beta$ -TCP und  $\beta$ -TCP' wurde die Biegefestigkeit bei einem Biegeversuch der Proben bestimmt. Die Biegefestigkeit zwischen  $\beta$ -TCP und  $\beta$ -TCP' steigt mit steigender Sintertemperatur. Hierbei konnte für  $\beta$ -TCP eine Biegefestigkeit von 68 N/mm<sup>2</sup> und für die  $\beta$ -TCP' 120 N/mm<sup>2</sup> ermittelt werden. Abbildung 3 zeigt eine Übersicht aller untersuchten Scaffolds.



**Abbildung 3.** Untersuchte Scaffolds in Kulturmedium. a: Poly-L-lactid acid-Calciumcarbonat (PLLA-CC), b: Poly-L-lactid acid-Tricalciumphosphat (PLLA-TCP), c: Poly-L-lactid acid-Polyglycolic acid-Calciumcarbonat (PLLA-PGA-CC), d: Poly-D,L-lactid acid-Magnesium (PDLLA-Mg), e: Poly-D,L-lactid acid (PDLLA), f:  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit ( $\beta$ -TCP-HA), g:  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP), h:  $\beta$ -Tricalciumphosphat' ( $\beta$ -TCP'). Maßstabsleiste = 10 mm.

## 2.2 Zellkultur

Für alle Versuche wurden humane Osteoblasten (Promocell, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Zunächst wurden die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen im Wasserbad bei 37 °C zwei Minuten lang aufgetaut. Die Zellen wurden anschließend in eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche (Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich) mit 15 ml vorgewärmtem Standardkulturmedium (Osteoblast Growth Medium, Promocell, Heidelberg, Deutschland) und 0,1 ml Antibiotikummix (Antibiotic Antimycotic Solution, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) pro 10 ml überführt. Die Inkubation fand bei 37°C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) statt. Der erste Mediumwechsel wurde nach 24 h durchgeführt, anschließend wurde das Medium alle zwei Tage ausgetauscht. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 70 - 90 % erreichten, erfolgte das Anlegen von Subkulturen (Passagieren). Hierbei wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgenommen, die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) gewaschen und durch Aufbringen von 2 ml Trypsin - Ethylendiamintetraacetat (EDTA) - Lösung (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) gelöst. Nach 5 Minuten Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>, wurde die Zellsuspension mit 5 ml Medium und 0,5 ml Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in ein Zentrifugen Röhrchen überführt und 5 min bei 300 rpm (Heraeus Biofuge Primo R, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 1 ml Medium suspendiert. Die Zellen wurden in der Neubauer-Zählkammer

(Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) ausgezählt und in einer Dichte von 10.000 Zellen/cm<sup>2</sup> neu ausgesät. Die Inkubation erfolgte weiter bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

### **2.3 Besiedelung der Biomaterialien und Kultivierung**

Vor der Besiedlung wurde die Gitterstruktur der Scaffolds in Medium in einer 100 ml Spritze unter Anlage eines Vakuums entlüftet und die Scaffolds 72 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in Standardkulturmedium zur Hydratisierung der Scaffoldmatrix inkubiert. Ziel war es, das spätere Einwachsen der Zellen in die Scaffoldstruktur zu erleichtern.

Zur Besiedlung wurden ausschließlich Osteoblasten der zweiten Passage verwendet. Die Zellen wurden durch Trypsinierung abgelöst (siehe 2.2) und in Standardkulturmedium resuspendiert, um eine Zellsuspension mit einer Endzellkonzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml zu erhalten. In einer 24-Well-Platte wurde je ein Scaffold pro Well platziert. Zur Besiedelung der Scaffolds wurde 0,1 ml Zellsuspension auf die hydrierten Scaffolds pipettiert. Um sicherzustellen, dass die Zellen homogen verteilt waren, wurde jeder Ansatz aus einer Zellsuspension pipettiert und zwischendurch mehrfach gevortext. Für Apoptose und Proliferations Assay wurden die Scaffolds mit jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen in einer Dichte von  $3,54 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>3</sup> besiedelt. Für Fluoreszenzmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie wurden die Scaffolds mit jeweils  $10 \times 10^6$  Zellen besiedelt. Um die Zelladhäsion zu ermöglichen, wurden die besiedelten Scaffolds 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde das Well mit 1 ml Kulturmedium aufgefüllt, sodass die Scaffolds von Medium bedeckt wurden. Im Verlauf wurde alle zwei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt.

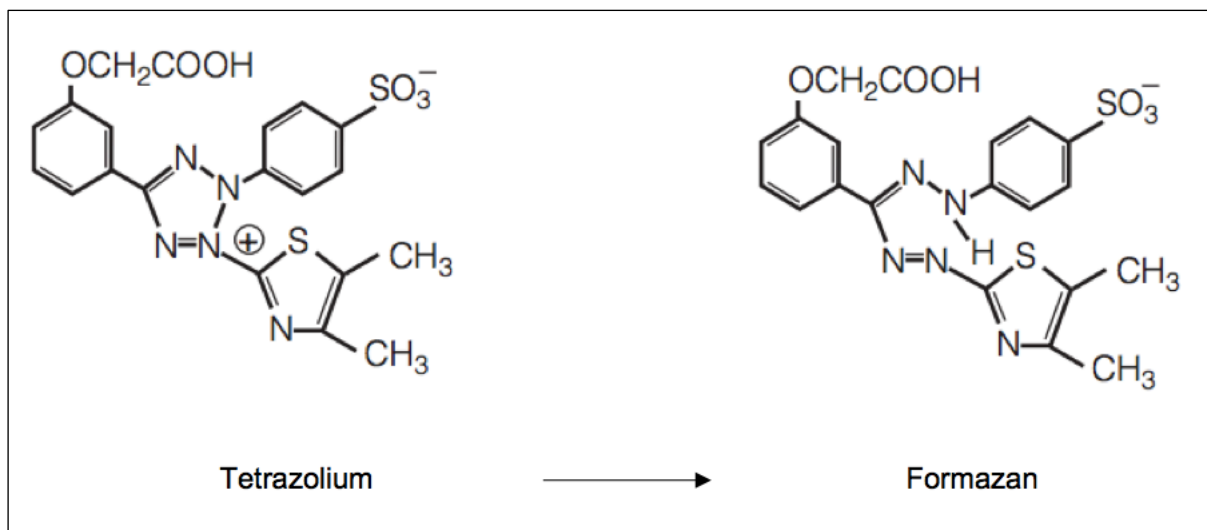
### **2.4 Proliferations Assay**

Die Anzahl der stoffwechselnden Zellen, die auf der Scaffoldoberfläche und in der Scaffoldmatrix wachsen, wurde mit Hilfe des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) Assays (CellTiter 96 ® AQ<sub>euous</sub> One Solution, Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) abgeschätzt. Bei diesem MTS Assay wird Tetrazolium verwendet, das von den Zellen zu violetterem Formazan umgesetzt wird, welches photometrisch gemessen werden kann (Abbildung 4). Die Menge des produzierten Formazan-Farbstoffs ist direkt proportional zur Zahl proliferierender Zellen in der Probe.

200 µl MTS Assay wurde zu jedem Scaffold in 1000 µl phenolfreiem Medium pro Well gegeben und 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion jeder

Probe dreifach bei 490 nm im Photometer (BioPhotometer plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gemessen. Die Extinktion eines Blindwertes (Scaffold, Medium und MTS ohne Zellen) wurde von den Messwerten abgezogen (Blank), um Störfaktoren wie die Auswirkungen der Materialien auf den Assay zu berücksichtigen. Nach der Messung wurde Medium und Assay entfernt, jeweils 1 ml Kulturmedium zu den Scaffolds gegeben und die Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> fortgesetzt. Da dieser Assay nicht zytotoxisch ist, ist er geeignet für Mehrfachmessungen über längere Zeiträume. Die Proben wurden an den Tagen 2, 5, 7, 14, und 21 analysiert (jeweils n = 8).

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Eichkurve mit humanen Osteoblasten durchgeführt. Hierfür wurden verschiedene Zellzahlen mit der Neubauer-Zählkammer (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) ausgezählt und 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einer 24-Well-Platte inkubiert. 100 µl MTS Assay wurde zu jedem Well in 1 ml phenolfreiem Medium gegeben und 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion jeder Probe dreifach bei 490 nm im Photometer (BioPhotometer plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gemessen und die jeweilige Extinktion pro Zellzahl in die Eichkurve eingetragen.



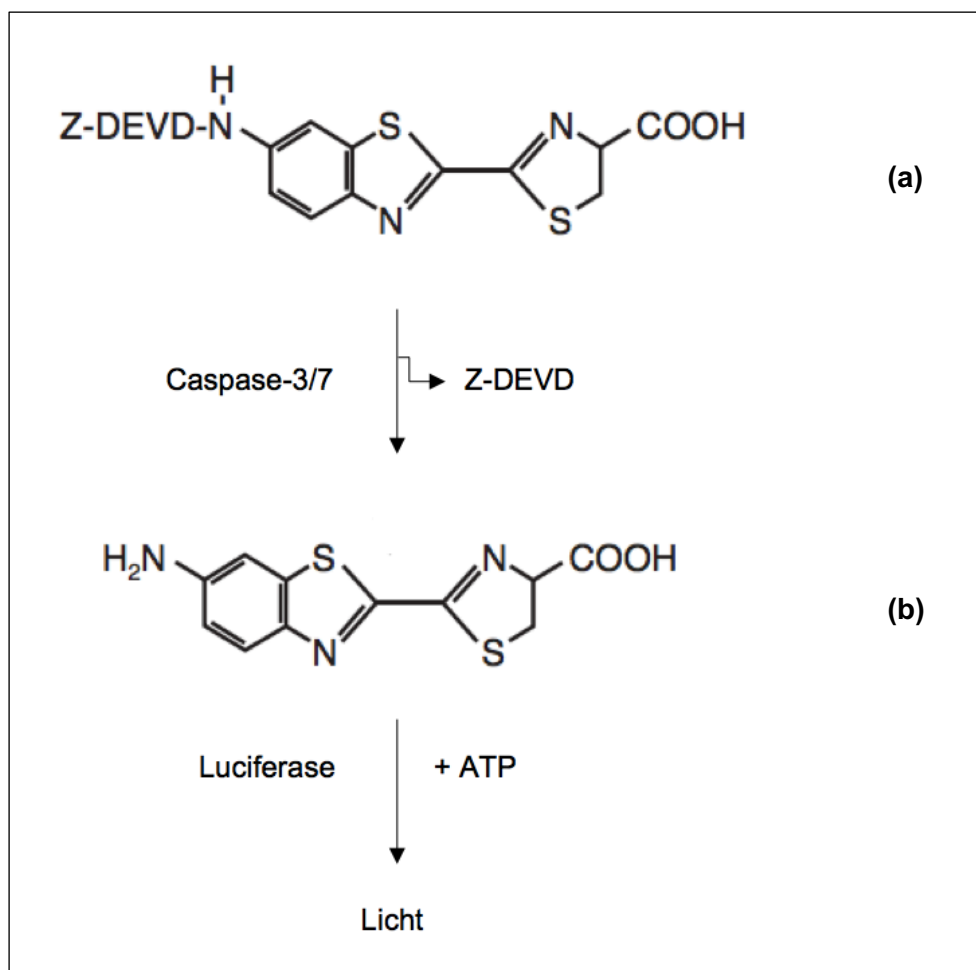
**Abbildung 4.** Umsetzung von Tetrazolium zu Formazan (modifiziert nach Technical Bulletin CellTiter 96 ® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA).

## 2.5 Apoptose Assay

Um die Apoptose-Aktivität der Zellen auf den Scaffolds zu beurteilen, wurde ein Apoptose Assay (Caspase-Glo ® 3/7 Assay, Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) durchgeführt, der die Caspase Aktivität misst. Es wurde ein Caspase-Substrat mit der Tetrapeptidsequenz DEVD verwendet, welches in der Anwesenheit vom Apoptose-Enzym Caspase-3/7,

Luciferase und Adenosintriphosphat (ATP) in der Luziferasereaktion und der Produktion von Licht resultiert (Abbildung 5). Diese Lumineszenz ist direkt proportional zur Apoptoseaktivität der Zellen.

Bei Raumtemperatur wurde 500 µl Caspase-Glo-Reagenz im Verhältnis 1:1 auf die in Medium befindlichen Scaffolds pipettiert, diese wurden anschließend auf dem Plate Shaker (30 Sekunden, 300-500 rpm) geschwenkt und bei konstanter Raumtemperatur 45 min inkubiert. Anschließend wurde die Lumineszenz jeder Probe dreifach im plate-reading Luminometer (Victor X2 Multiwell Plate Reader, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) gemessen. Die Proben wurden an den Tagen 2, 5, 7, 14, und 21 analysiert (jeweils n = 8). Zur Bestimmung der Apoptoseaktivität bezogen auf die stoffwechselnden Zellen im Scaffold wurde der Quotient Apoptose-Wert (Lumineszenz)/Zellzahl im Scaffold gebildet. Mithilfe eines Etablierungsversuchs wurde nachgewiesen, dass das Assay nicht zytotoxisch und daher geeignet für Messreihen über längere Zeiträume ist. Hierzu wurde mittels MTS Assay die Proliferationsrate von mit Apoptose-Assay inkubierten Zellen überprüft.



**Abbildung 5.** Apoptose Assay. Durch Spaltung des Caspase-Substrats (a) durch Caspase-3/7 wird ein Luciferasesubstrat (b) freigesetzt. In Gegenwart von Luciferase und ATP resultiert die Produktion von Licht (modifiziert nach Technical Bulletin Caspase-Glo® 3/7 Assay, Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA).

## 2.6 Zytotoxizitäts Assay

Der Zytotoxizitäts Assay wurde gemäß ISO10993-5 durchgeführt. Hier wurden keine besiedelten Scaffolds verwendet, sondern adhärenente Zellen in Monolayerkultur untersucht, die in Scaffold-Extrakt inkubiert wurden.

Die Extrakte der Scaffolds wurden hergestellt, indem die Scaffolds für 72 h in jeweils 2 ml serumhaltigem Kulturmedium hydriert wurden, um potentiell zytotoxische Substanzen im Medium anzureichern. Humane Osteoblasten wurden in 96-Well-Platten mit einer Dichte von 1000 Zellen pro Well in 100 µl Standardkulturmedium für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurde das Medium durch 100 µl des jeweiligen Extrakts ausgetauscht und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für weitere 24 h inkubiert (jeweils n = 8). Dies wurde für jedes Material mit den Extrakt-Verdünnungen 100 %, 75 %, 50 % und 25 % durchgeführt. Als Negativkontrolle diente der Extrakt von ThinCert Membranen (Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich), die als besonders zellverträglich gelten. Als Positivkontrolle wurde 100 % Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Die Zellviabilität wurde anschließend mit Hilfe des Proliferations-Assays (CellTiter 96® AQ<sub>euous</sub> One Solution, Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) beurteilt. 20 µl MTS Assay wurde zu jedem Zellpellet in 100 µl phenolfreiem Medium pro Well gegeben und 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion jeder Probe dreifach bei 490 nm im Photometer (BioPhotometer plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gemessen. Als Blank diente Medium mit MTS ohne Zellen. Die ISO 10993-5 schreibt vor, dass die Extinktion und somit auch die Zellviabilität mindestens 70 % vom Wert der Negativkontrolle darstellen muss, um ein Material als nicht zytotoxisch einzustufen. Die Anwendung dieser Vorgabe auf die vorliegende Studie ergab folgende Formel für die Zellviabilität in Prozent:

$$\text{Zellviabilität in \%} = \frac{(\text{Extinktion Probe} - \text{Extinktion Blank})}{(\text{Extinktion Negativkontrolle} - \text{Extinktion Blank})} \times 100$$

## 2.7 Sulforhodamin B Assay

Der Sulforhodamin B Assay erlaubt durch Messung von Proteinmengen Rückschlüsse auf die Zellzahl der im Milieu der Scaffolds wachsenden Osteoblasten. Hier wurden keine besiedelten Scaffolds verwendet, sondern Zellen in Monolayerkultur untersucht, die über einen Zeitraum von 7 Tagen im Scaffold-Extrakt bei indirektem Materialkontakt kultiviert wurden.

Humane Osteoblasten wurden in 6-Well-Platten mit einer Dichte von 100.000 Zellen pro Well ausgesät. Mithilfe von ThinCert-Einsätzen (Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich)

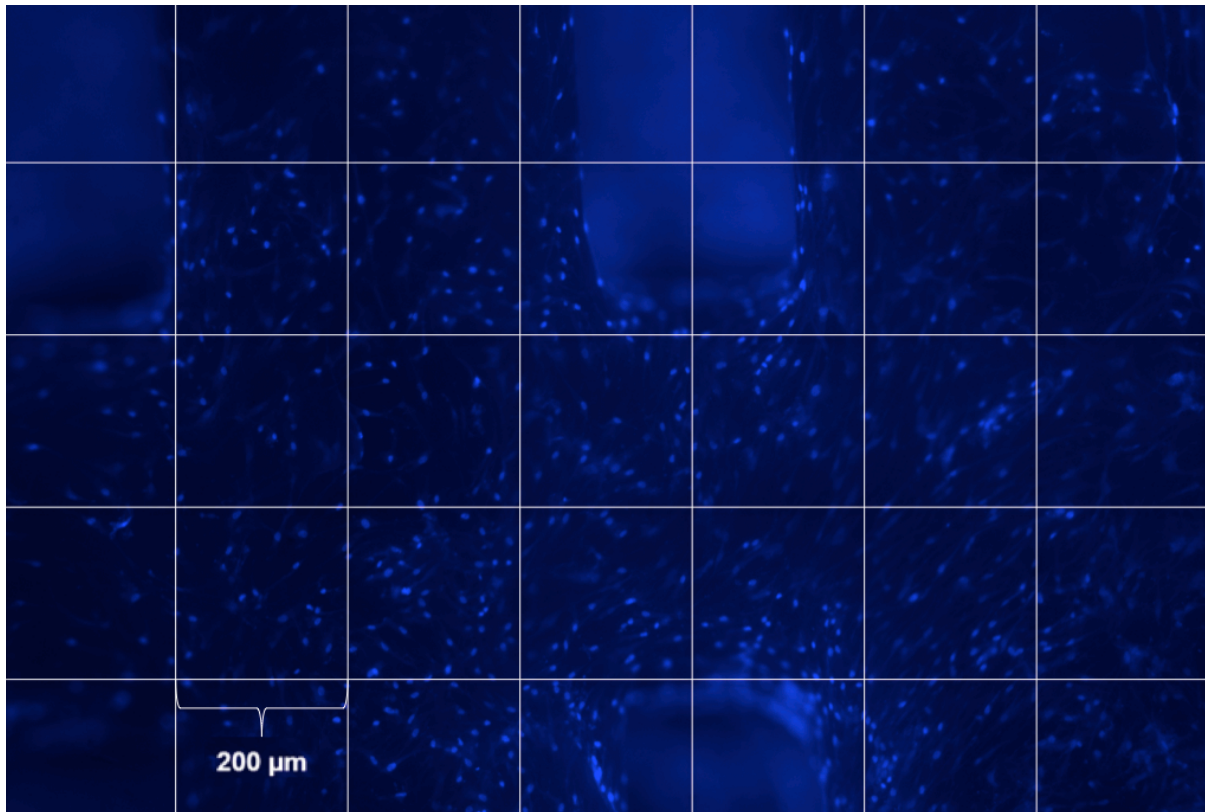
wurden die Scaffolds im Medium über den Zellen eingesetzt. So war es möglich zu untersuchen, ob die Materialien auch über längere Zeiträume zytotoxische Substanzen ins Medium abgeben und inwiefern dies die Zellzahl und somit das Zellwachstum beeinflusst.

Die Zellen wurden an den Messtagen mit Methanol (99 %, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert und bei -80 °C gelagert. Zur Färbung wurde das Methanol aus den Wells entfernt und die Zellen mit 500 µl SRB-Färbelösung bedeckt (1 % Essigsäurelösung, 0,4 % (w/v) Sulforhodamin B Natriumsalz, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Die Inkubation erfolge für 30 min bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken. Danach wurde die SRB-Färbelösung entfernt und die fixierten Zellen fünfmalig mit 1 %iger Essigsäurelösung gewaschen. Die gefärbten Zellen wurden getrocknet und nach 24 h in 2 ml 10 mM Tris-Puffer gelöst. Anschließend wurde die Extinktion jeder Probe dreifach bei 550 nm im Photometer (BioPhotometer plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gemessen. Als Blank diente Medium ohne Zellen. Die Proben wurden an den Tagen 2, 5 und 7 analysiert (jeweils n = 8).

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Eichkurve mit humanen Osteoblasten durchgeführt. Hierfür wurden verschiedene Zellzahlen mit der Neubauer-Zählkammer (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) ausgezählt und 4 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einer 24-Well-Platte inkubiert. Anschließend wurde jede Probe wie beschrieben vorbehandelt und die jeweilige Extinktion dreifach bei 490 nm im Photometer (BioPhotometer plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gemessen und die jeweilige Extinktion pro Zellzahl in die Eichkurve eingetragen.

## **2.8 Fluoreszenzmikroskopie**

Zur optischen Validierung des Besiedelungserfolges nach 21 Tagen wurden die Scaffolds fluoreszenzmikroskopisch evaluiert. Zusätzliche Scaffolds (n = 2) wurden mit 10 Millionen Zellen besiedelt und über 21 Tage in Differenzierungsmedium (StemMACS™ OsteoDiff Media (human), Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) kultiviert und anschließend in 3 % Formaldehyd fixiert. Sie wurden in einer 24-Well-Plate mit 1 ml Hoechst Staining Solution (Hoechst 33342 (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) in PBS, 1:2000) bedeckt und 10 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie in ein mit 1 ml PBS gefülltes Well umgesetzt und darin unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (BZ-9000 BioRevo, Keyence, Osaka, Japan) mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Filter betrachtet.



**Abbildung 6.** Semiquantitative Auswertung der Oberflächenbesiedelung mittels Zählraster. Quadrate, die Poren enthalten, wurden nicht mitausgezählt.

Um die Anzahl der Zellen auf der Scaffoldoberfläche beurteilen zu können wurden die fluoreszenzmikroskopischen Bilder semiquantitativ ausgewertet, indem die Zellzahl/mm<sup>2</sup> bestimmt wurde. Zum Auszählen wurden Felder einer definierten Fläche benutzt (200 x 200 μm) (Abbildung 6). Es wurden nur Quadrate ausgezählt, in denen keine Poren zu sehen waren. Zur Beurteilung wurden Felder vergleichbarer Scaffold-Areale herangezogen. Zellen, die die Begrenzungslinie berühren, wurden an zwei Seiten (oben und rechts) mitgezählt und an zwei Seiten (unten und links) nicht mitgezählt. Um Ungenauigkeiten zu vermeiden, wurden die Werte der einzelnen Felder jeweils auf Homogenität überprüft, bevor der Wert Zellzahl/mm<sup>2</sup> mittels folgender Formel bestimmt wurde:

$$\text{Zellzahl/mm}^2 = \frac{\text{Anzahl der ausgezählten Zellen}}{(\text{Anzahl der ausgezählten Felder} \times 0,2 \text{ mm} \times 0,2 \text{ mm})}$$

## 2.9 Rasterelektronenmikroskopie

Für die Untersuchung der Zell-Morphologie wurden besiedelte Scaffolds unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM) betrachtet, das Abbildungen der Oberflächenstrukturen mit sehr hoher Auflösung erzeugt.



Für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung wurden zusätzliche Scaffolds (n = 2) mit 10 Millionen Zellen besiedelt und über 21 Tage in Differenzierungsmedium (StemMACS™ OsteoDiff Media (human), Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) kultiviert. Anschließend wurden sie mithilfe einer Fixierreihe fixiert. Hierfür wurden zunächst Puffer (Sorensen Puffer und Glutaraldehyd Lösung) vorbereitet (Tabelle 1). Für die anschließende Fixierung wurde jeweils 5 ml der jeweiligen Lösung verwendet. Zunächst wurde jede Probe mit Sorensen Puffer für 2 min gespült und anschließend mit Hilfe von 2,5 %iger Glutaraldehyd Lösung durch eine 30-minütige Inkubation fixiert. Es folgte eine erneute Spülung mit Sorensen Puffer, sowie eine fünfmalige Spülung mit destilliertem Wasser (H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>). Die Ansätze wurden anschließend mit Ethanol (EtOH, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in aufsteigender Konzentration (30 %, 50 %, 75 %, 95 %, 100 %) dehydriert und zum Abschluss zweimalig in Hexamethyldisilazan (HMDS, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gewaschen (Tabelle 2). Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach der Fixierung wurden die Proben über Nacht getrocknet und anschließend unter dem Rasterelektronenmikroskop (Zeiss-LEO DSM 982, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) betrachtet. Von jedem Material wurden Aufnahmen von besiedelten und unbesiedelten Scaffolds (jeweils n = 2) gemacht.

**Tabelle 1.** Vorbereitung der Puffer für die Rasterelektronenmikroskopie.

2x Sorensen Puffer (100 ml, pH 7,2)	72,6 ml Dinatriumhydrogenphosphat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) 27,4 ml Kaliumdihydrogenphosphat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
1x Sorensen Puffer	100 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> . 100 ml 2x Sorensen Puffer
2,5 %ige Glutaraldehyd Lösung	1 ml Glutaraldehyd (25 % Stock Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 4 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> 5 ml 2x Sorensen Puffer

**Tabelle 2.** Fixierreihe Rasterelektronenmikroskopie.

<u>Lösung</u>	<u>Einwirkzeit</u>
1x Sorensen Puffer	2 min
2,5 %ige Glutaraldehyd Lösung	30 min
1x Sorensen Puffer	10 min
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	10 min

H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	10 min
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	5 min
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	5 min
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	5 min
30 % EtOH	10 min
50 % EtOH	10 min
75 % EtOH	10 min
95 % EtOH	10 min
100 % EtOH	10 min
HMDS	15 min
HMDS	15 min

## 2.10 Statistische Analyse

Die Daten für die durchgeführten Tests sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die statistische Analyse wurde mittels GraphPad Prism (Version 8 für Mac OS X, GraphPad Software, La Jolla, USA) durchgeführt. Um die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten und Gruppen zu evaluieren, wurde eine one-way Analysis of variance (Varianzanalyse, ANOVA) und ein Friedman-Test verwendet, gefolgt von Dunn's post hoc multiple comparisons. Ein t-Test und Mann-Whitney U-Test wurde für die Signifikanz der Viabilität im Zytotoxizitätstest durchgeführt. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Proliferations Assay

Die initiale Zellzahl bei der Besiedelung betrug  $2 \times 10^5$  Zellen/Scaffold. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Eichkurve bestimmt (Abbildung 7). An Tag 2 erfolgte die erste Messung, die Zellzahl an Tag 21 wurde jeweils im Vergleich mit Tag 2, 5, 7 und 14 evaluiert.

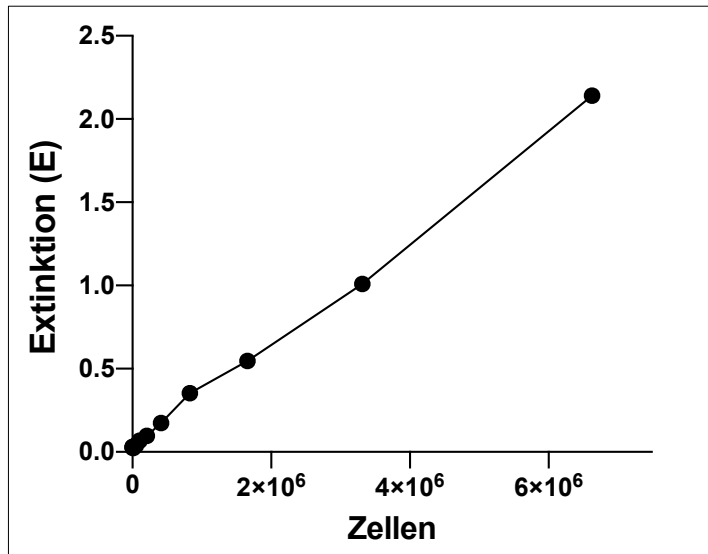


Abbildung 7. Eichkurve Proliferations Assay.

In der Gruppe der PLLA-basierten Polymere enthielt das PLLA-CC Scaffold  $2,77 \times 10^5$  ( $\pm 0,34 \times 10^5$ ) Zellen an Tag 2. Nach einem leichten Rückgang der Zellzahl an Tag 5 ( $2,01 \times 10^5 \pm 0,80 \times 10^5$ ) und Tag 14 ( $2,36 \times 10^5 \pm 0,51 \times 10^5$ ) zeigte sich nach 21 Tagen ein Anstieg der Zellzahl/Scaffold auf  $4,20 \times 10^5$  ( $\pm 0,63 \times 10^5$ ) ( $p < 0,05$ ). Beim PLLA-TCP war die Zellzahl bis Tag 7 steigend ( $8,28 \times 10^5 \pm 1,34 \times 10^5$ ), an Tag 14 sank sie auf  $3,17 \times 10^5$  ( $\pm 0,93 \times 10^5$ ), um an Messtag 21 auf  $4,49 \times 10^5$  ( $\pm 1,03 \times 10^5$ ) Zellen/Scaffold zu steigen. Der Anstieg zwischen Tag 21 und Tag 14 war signifikant ( $p < 0,05$ ). Bei PLLA-PGA-CC stieg die Zellzahl von Tag 2 ( $4,37 \times 10^5 \pm 0,56 \times 10^5$ ) über Tag 5 ( $3,48 \times 10^5 \pm 1,16 \times 10^5$ ) und 14 ( $4,07 \times 10^5 \pm 0,62 \times 10^5$ ) an Tag 21 auf  $5,74 \times 10^5$  ( $\pm 0,61 \times 10^5$ ) an ( $p < 0,05$ ). Im Gesamtverlauf ergaben sich die höchsten Werte an Tag 7 mit  $10,15 \times 10^5$  ( $\pm 2,30 \times 10^5$ ) Zellen. PLLA-PGA-CC zeigte in der Gruppe der PLLA-basierten Polymere im Zeitverlauf die höchsten Zellzahlen (Abbildung 8 oben, Abbildung 9 links).

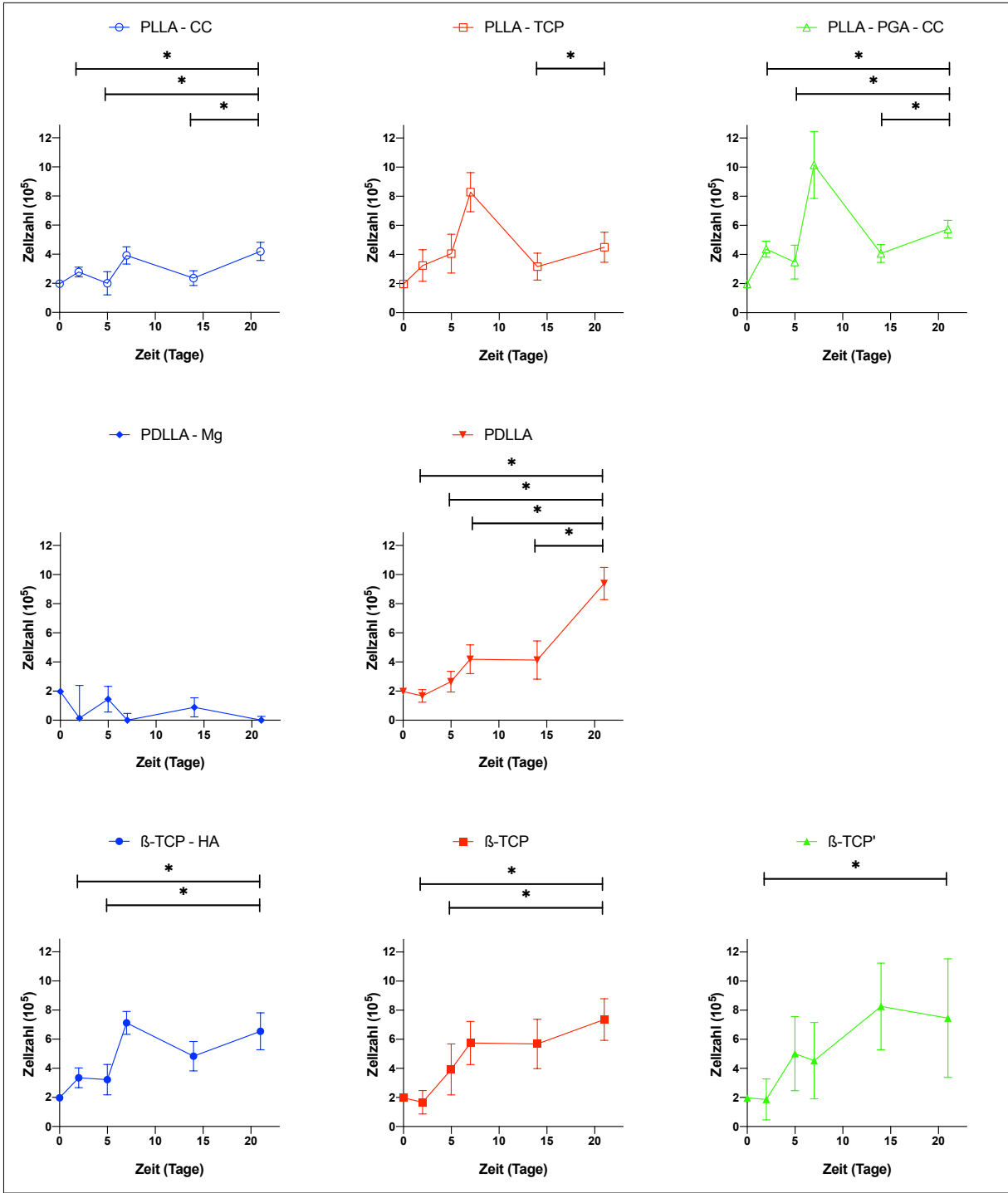
Beim PDLLA-Mg war die Zellzahl insgesamt sinkend von  $0,14 \times 10^5$  ( $\pm 2,25 \times 10^5$ ) an Tag 2 auf  $0 \times 10^5$  ( $\pm 0,26 \times 10^5$ ) an Tag 21. Im gesamten Kurvenverlauf kam es nur an Tag 5 ( $1,44 \times 10^5 \pm 0,88 \times 10^5$ ) und 14 ( $0,89 \times 10^5 \pm 0,66 \times 10^5$ ) zu einem vorübergehenden leichten

Anstieg. PDLLA stieg von Tag 2 ( $1,67 \times 10^5 \pm 0,44 \times 10^5$ ) über Tag 5 ( $2,65 \times 10^5 \pm 0,71 \times 10^5$ ), 7 ( $4,19 \times 10^5 \pm 1,00 \times 10^5$ ) und 14 ( $4,13 \times 10^5 \pm 1,31 \times 10^5$ ) stetig an bis zum Tag 21 ( $9,39 \times 10^5 \pm 1,12 \times 10^5$ ) (jeweils  $p < 0,05$ ). In der Gruppe der PDLLA-basierten Polymere zeigte PDLLA im Zeitverlauf die besten Messwerte (Abbildung 8 mittig, Abbildung 9 mittig).

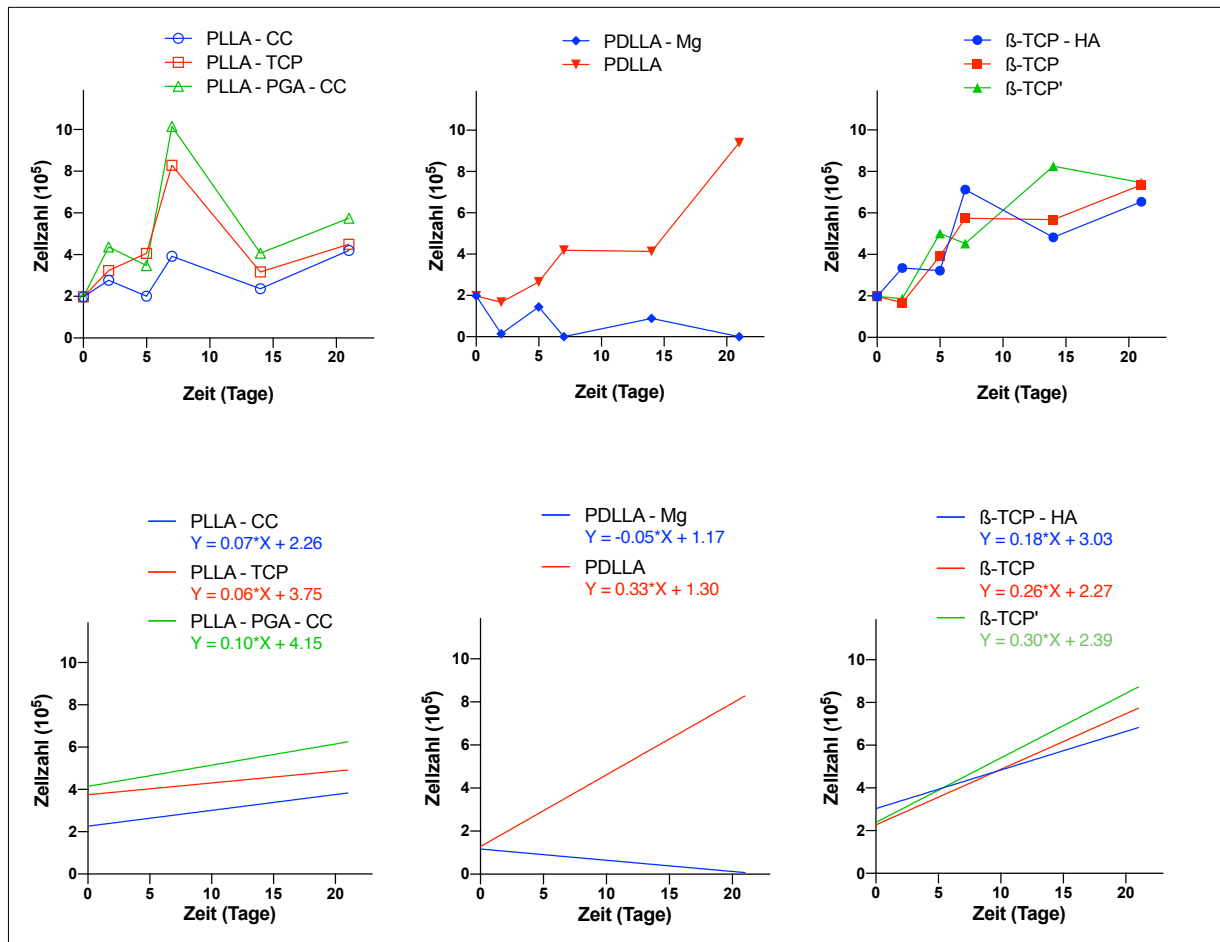
Bei den Keramiken ließ sich beim  $\beta$ -TCP-HA ein Anstieg der Zellzahl an Tag 21 auf  $6,54 \times 10^5 (\pm 1,26 \times 10^5)$  verglichen mit Tag 2 ( $3,34 \times 10^5 \pm 0,68 \times 10^5$ ), 5 ( $3,22 \times 10^5 \pm 1,05 \times 10^5$ ) und 14 ( $4,83 \times 10^5 \pm 1,01 \times 10^5$ ) beobachten ( $p < 0,05$  für Tag 2 und 5).  $\beta$ -TCP stieg von Tag 2 ( $1,67 \times 10^5 \pm 0,80 \times 10^5$ ) über Tag 5 ( $3,93 \times 10^5 \pm 1,75 \times 10^5$ ), 7 ( $5,74 \times 10^5 \pm 1,49 \times 10^5$ ) und 14 ( $5,68 \times 10^5 \pm 1,70 \times 10^5$ ) bis zum Tag 21 ( $7,35 \times 10^5 \pm 1,43 \times 10^5$ ) stetig an ( $p < 0,05$  für Tag 2 und 5). Auch  $\beta$ -TCP' zeigte einen signifikanten Anstieg der Zellzahl an Tag 21 ( $7,46 \times 10^5 \pm 4,07 \times 10^5$ ) verglichen mit Tag 2 ( $1,87 \times 10^5 \pm 1,41 \times 10^5$ ) ( $p < 0,05$ ), sowie einen Anstieg an Tag 5 ( $5,01 \times 10^5 \pm 2,55 \times 10^5$ ) und 7 ( $4,53 \times 10^5 \pm 2,62 \times 10^5$ ). Tag 14 zeigte mit  $8,26 \times 10^5 (\pm 2,98 \times 10^5)$  die höchste Zellzahl (Abbildung 8 unten, Abbildung 9 rechts).

Bei den Ausgleichsgeraden (Abbildung 9 unten) zur Bestimmung der Wachstumstendenz wiesen PLLA-PGA-CC, PDLLA,  $\beta$ -TCP-HA,  $\beta$ -TCP und  $\beta$ -TCP' die größte Steigung ( $\geq 0,1$ ) auf. Die Steigung der Ausgleichsgerade von PDLLA-Mg war negativ ( $-0,05$ ).

Zusammenfassend haben im Zeitverlauf PDLLA,  $\beta$ -TCP-HA,  $\beta$ -TCP und  $\beta$ -TCP' die höchsten Zellzahlen ergeben. Die niedrigsten Zellzahlen zeigte PDLLA-Mg.



**Abbildung 8.** Proliferations Assay der einzelnen Materialien. Bestimmung der Zahl proliferierender Zellen in den Scaffolds nach 2, 5, 7, 14 und 21 Tagen. \*: Statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 9.** Proliferations Assay. Bestimmung der Zahl proliferierender Zellen in den Scaffolds nach 2, 5, 7, 14 und 21 Tagen (oben). Ausgleichsgeraden zur Bestimmung der Wachstumstendenz (unten).

### 3.2 Apoptose Assay

Um die Apoptoseaktivität bezogen auf die stoffwechselnden Zellen zu bestimmen, wurde der Quotient Apoptose-Wert (Lumineszenz)/Zellzahl im Scaffold gebildet.

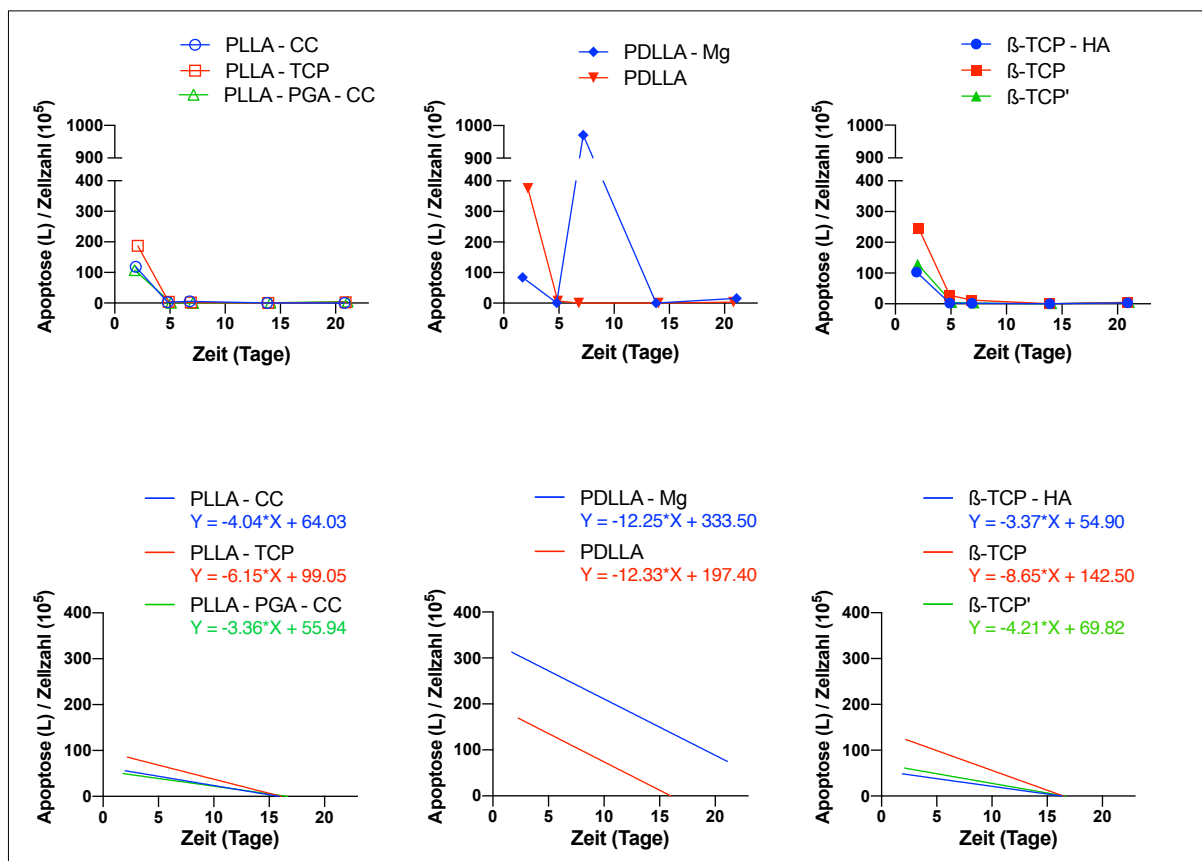
Die PLLA-basierten Polymere zeigten alle einen ähnlichen Verlauf der Apoptoseaktivität über den Beobachtungszeitraum. Bei PLLA-CC war die Apoptoseaktivität an Tag 2 mit  $118,57 \times 10^{-5}$  ( $\pm 19,6 \times 10^{-5}$ ) signifikant erhöht gegenüber den Tagen 5, 7, 14 und 21, an denen der Wert gegen Null ging (range 0 -  $5,29 \times 10^{-5}$ ) ( $p < 0,05$ ). Auch PLLA-TCP mit einem Wert von  $187,19 \times 10^{-5}$  ( $\pm 32,2 \times 10^{-5}$ ) sowie PLLA-PGA-CC mit  $107,32 \times 10^{-5}$  ( $\pm 21,9 \times 10^{-5}$ ) zeigten an Tag 2 eine erhöhte Apoptoseaktivität verglichen mit den anderen Messzeitpunkten ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 10, links).

Nach anfangs erhöhtem Apoptosewert an Tag 2 ( $84,15 \times 10^{-5} \pm 53,8 \times 10^{-5}$ ) sank bei PDLLA-Mg die Apoptoseaktivität zunächst auf  $1,44 \times 10^{-5}$  ( $\pm 2,5 \times 10^{-5}$ ) an Tag 5, um an Tag 7 wieder signifikant anzusteigen ( $971,03 \times 10^{-5} \pm 1358,9 \times 10^{-5}$ ) ( $p < 0,05$ ). Im weiteren Verlauf blieb sie leicht erhöht mit einem Wert von  $15,40 \times 10^{-5}$  ( $\pm 9,5 \times 10^{-5}$ ) an Tag 21 ( $p < 0,05$ ).

gegenüber Tag 5). Bei PDLLA war die Apoptoseaktivität nur an Tag 2 signifikant erhöht ( $375,48 \times 10^{-5} \pm 25,6 \times 10^{-5}$ ) und sank dann auf niedrige Werte zwischen  $0 - 7,01 \times 10^{-5}$  (Abbildung 10, mittig).

Die Keramiken zeigten untereinander einen ähnlichen Verlauf der Apoptoseaktivität.  $\beta$ -TCP-HA mit einem Wert von  $103,52 \times 10^{-5} (\pm 32,5 \times 10^{-5})$  an Tag 2 und  $\beta$ -TCP' mit  $129,85 \times 10^{-5} (\pm 30,5 \times 10^{-5})$  an Tag 2 zeigten eine signifikant erhöhte Apoptoseaktivität gegenüber den Tagen 5, 7, 14 und 21, an denen die Werte auf  $0 - 4,79 \times 10^{-5}$  sanken. Auch bei  $\beta$ -TCP war der Wert an Tag 2 ( $246,27 \times 10^{-5} \pm 34,9 \times 10^{-5}$ ) erhöht ( $p < 0,05$ ), die Kurve flachte hier etwas langsamer ab (Abbildung 10, rechts).

Zusammenfassend sank bei den PLLA-basierten Polymeren, bei PDLLA und den Keramik Scaffolds nach anfänglich erhöhter Apoptoseaktivität an Tag 2 die Apoptose im Verlauf gegen Null. Bei PDLLA-Mg zeigte sich an Tag 7 ein erneuter Peak der Apoptoseaktivität sowie ein leichtes Wiederansteigen der Apoptose nach 21 Tagen.

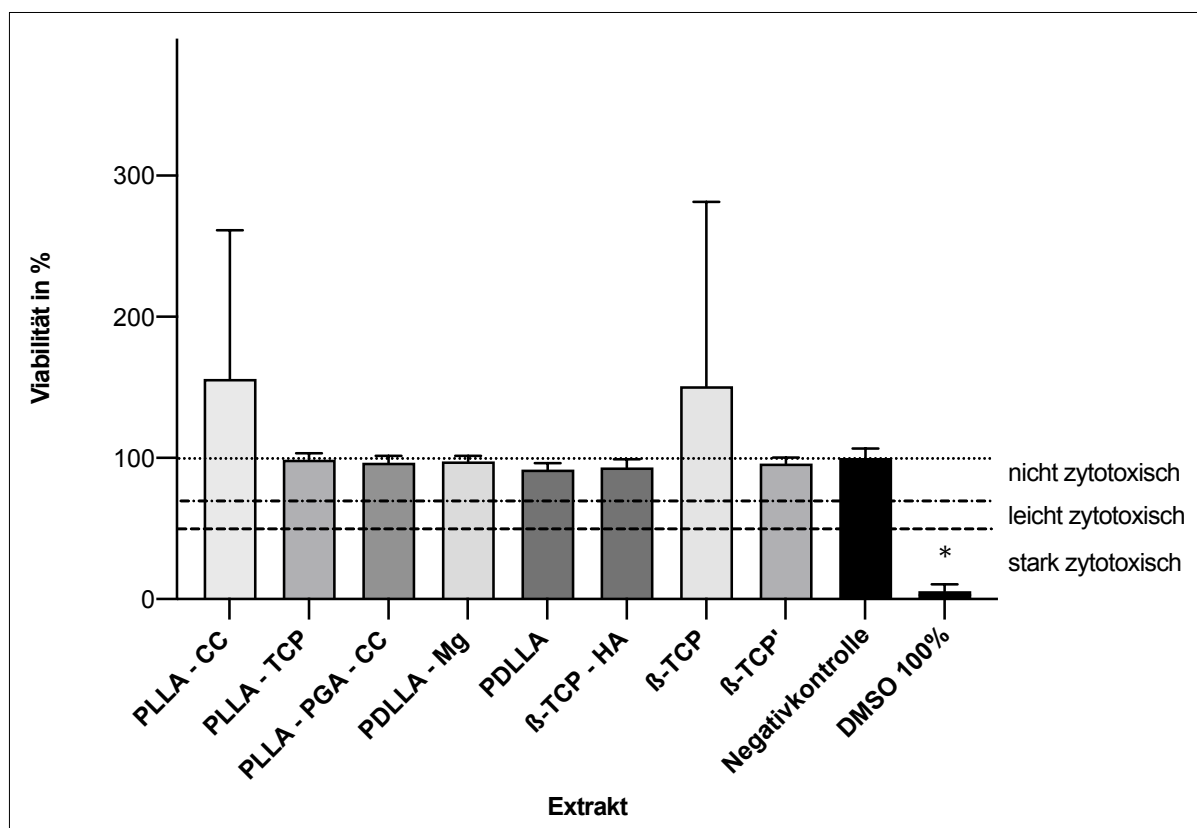


**Abbildung 10.** Apoptose Assay. Bestimmung der Apoptoseaktivität bezogen auf die Zellzahl im Scaffold nach 2, 5, 7, 14 und 21 Tagen (oben). Ausgleichsgeraden zur Bestimmung der Apoptosetendenz im Verlauf (unten). L: Lumineszenz.

### 3.3 Zytotoxizitäts Assay

Die Proliferation von humanen Osteoblasten wurde durch die Extrakte (100 % unverdünnter Extrakt) der Biomaterialien nicht beeinflusst (Abbildung 11). Das Zellwachstum und der Metabolismus waren im Vergleich zur nicht-zytotoxischen Kontrolle (Negativkontrolle) unverändert. Der negative Kontrollwert wurde auf 100 % gesetzt. Der Vitalitätswert bei Extrakten aus PLLA-CC (156 %) und  $\beta$ -TCP (151 %) lag sogar über der Negativkontrolle. Die in 100 % DMSO (positive, zytotoxische Kontrolle) inkubierten Zellen spiegelten die zytotoxische Wirkung von DMSO auf die Viabilität ( $5,6 \pm 4,8$  %) wider. Die Viabilität der in DMSO kultivierten humanen Osteoblasten war im Vergleich zur Negativkontrolle und den untersuchten Extrakten signifikant verringert ( $p < 0,05$ ).

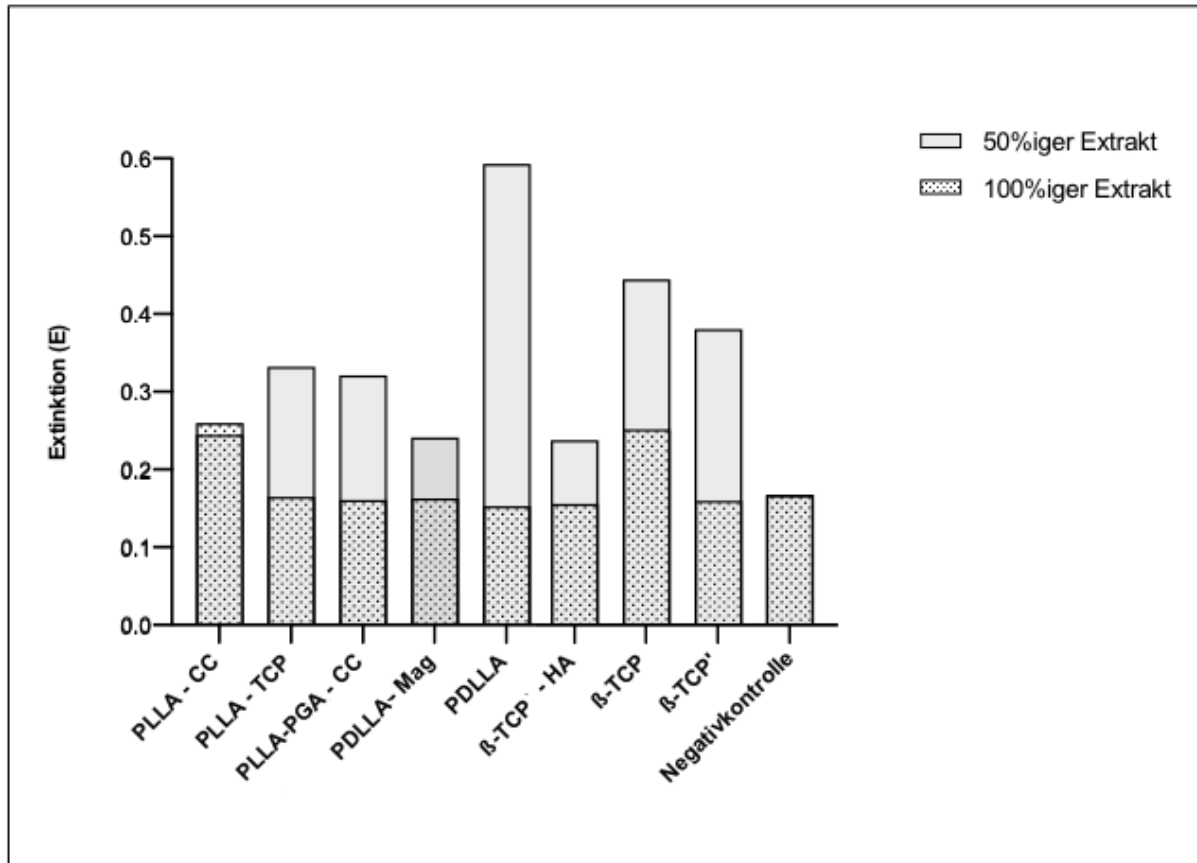
Gemäß den ISO-Richtlinien spiegelt eine Viabilität der Zellen im Bereich zwischen 0 % und 50 % eine starke zytotoxische Wirkung der getesteten Extrakte wider, während Werte zwischen 70 % und 100 % das Fehlen zytotoxischer Komponenten widerspiegeln.



**Abbildung 11.** In-vitro Zytotoxizität bei 100 %igem unverdünntem Extrakt. Die humanen Osteoblasten die in Kontrolleextrakt (Negativkontrolle = gepunktete Linie, 100 %) oder in unverdünntem Extrakt der Scaffolds kultiviert wurden zeigen alle eine hohe Viabilität. \*: Die Viabilität der in Dimethylsulfoxid (DMSO) (positive, zytotoxische Kontrolle) kultivierten Osteoblasten war im Vergleich zu den untersuchten Extrakten statistisch signifikant verringert ( $p < 0,05$ ).



Die Werte der 50 %igen Extrakt-Verdünnungen war für alle Biomaterialien mindestens so hoch oder höher als die der 100 %igen Extrakte, wie in der ISO-Richtlinie gefordert (Abbildung 12).



**Abbildung 12.** Extinktion bei 50 %igem und 100 %igem Extrakt. Die Extinktion ist direkt proportional zur Zahl stoffwechselnder Zellen und somit zur Viabilität. Die Werte der 50 %igen Extrakt-Verdünnungen war für alle Biomaterialien mindestens so hoch wie die der 100 %igen Extrakte, wie in der ISO-Richtlinie gefordert.

### 3.4 Sulforhodamin B Assay

Die initiale Zellzahl bei der Besiedelung betrug  $1 \times 10^5$  Zellen/Scaffold. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Eichkurve bestimmt (Abbildung 13). An Tag 2 erfolgte die erste Messung.

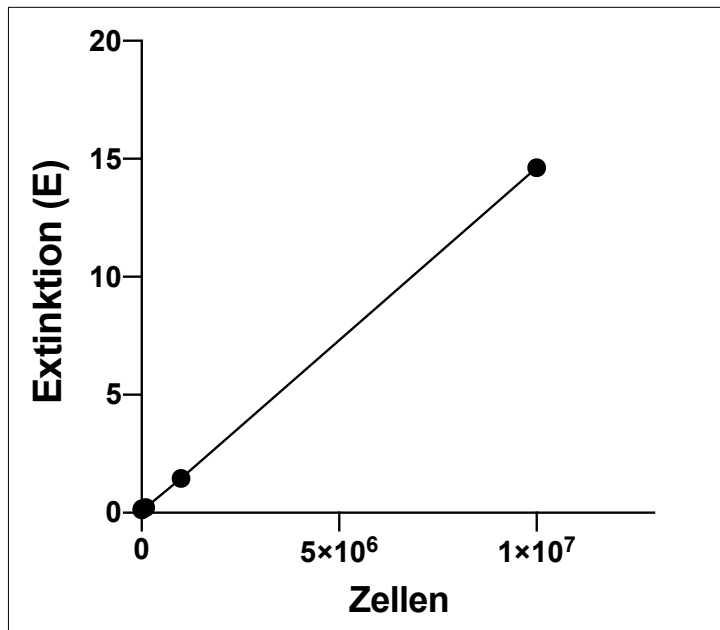


Abbildung 13. Eichkurve Sulforhodamin B Assay.

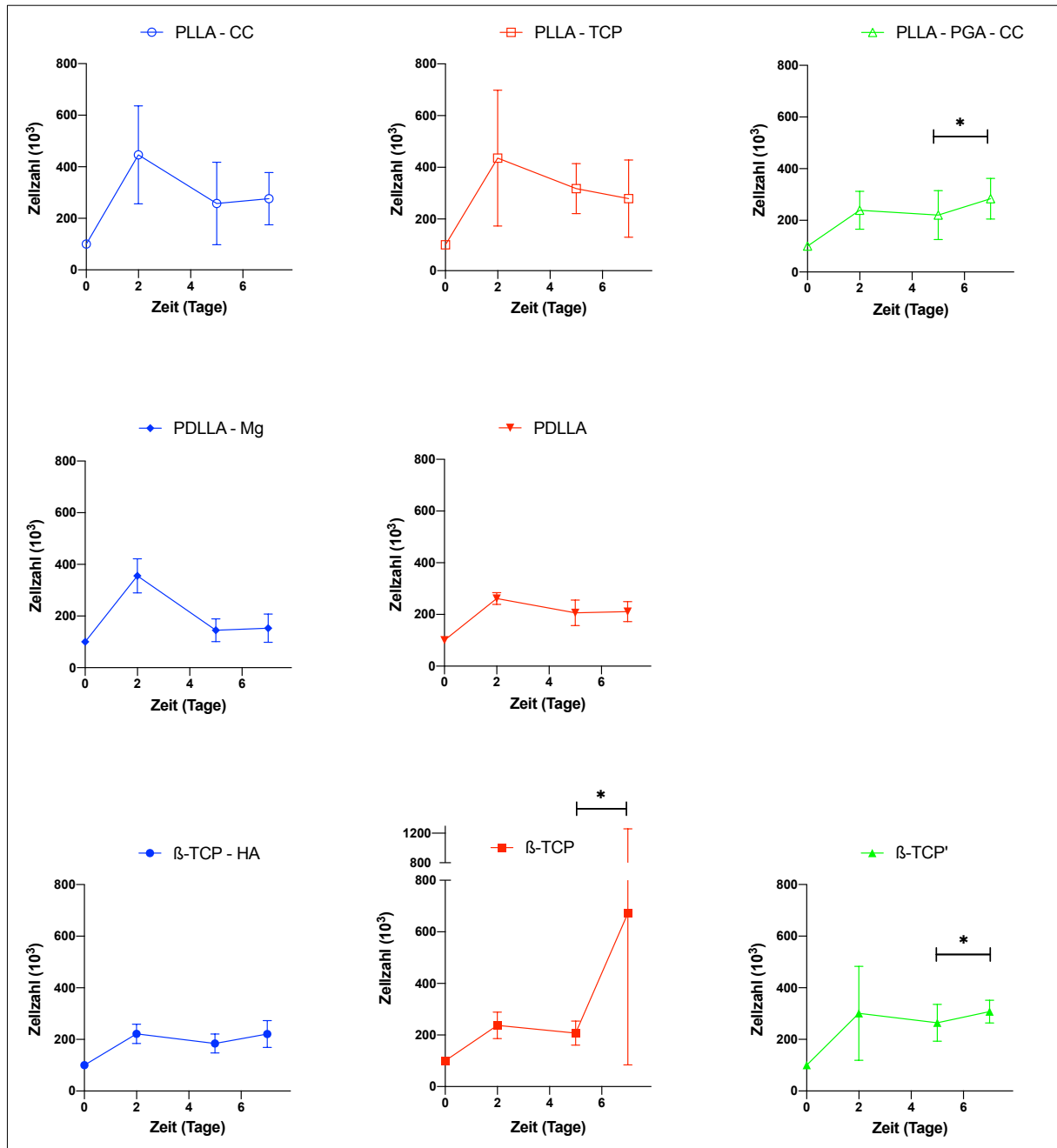
Nach einem Anstieg der Zellzahl an Tag 2 auf  $4,46 \times 10^5 (\pm 1,90 \times 10^5)$  fiel bei PLLA-CC die Zellzahl an Tag 5 wieder ab ( $2,57 \times 10^5 \pm 1,60 \times 10^5$ ), um an Tag 7 nahezu unverändert zu bleiben ( $2,76 \times 10^5 \pm 1,01 \times 10^5$ ). Beim PLLA-TCP war die Zellzahl nach Tag 2 ( $4,36 \times 10^5 \pm 2,63 \times 10^5$ ) fallend mit  $3,18 \times 10^5 (\pm 0,97 \times 10^5)$  Zellen an Tag 5 und  $2,79 \times 10^5 (\pm 1,49 \times 10^5)$  an Tag 7. PLLA-PGA-CC zeigte an Tag 2 mit einem Wert von  $2,38 \times 10^5 (\pm 0,74 \times 10^5)$  und Tag 5 mit  $2,20 \times 10^5 (\pm 0,95 \times 10^5)$  nahezu konstante Zellzahlen. An Tag 7 kam es zu einem signifikanten Anstieg auf  $2,84 \times 10^5 (\pm 0,79 \times 10^5)$  Zellen verglichen mit Tag 5 ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 14 oben, Abbildung 15 links).

Beginnend mit einer Zellzahl von  $3,56 \times 10^5 (\pm 0,66 \times 10^5)$  an Tag 2 fiel beim PDLLA-Mg die Zellzahl an Tag 5 auf  $1,45 \times 10^5 (\pm 0,44 \times 10^5)$ , um an Tag 7 nahezu unverändert zu bleiben ( $1,52 \times 10^5 \pm 0,55 \times 10^5$ ). Beim PDLLA wurde an Tag 2 ein Wert von  $2,61 \times 10^5 (\pm 0,23 \times 10^5)$  beobachtet. An Tag 5 kam es zu einer leichten Abnahme der Zellzahl ( $2,06 \times 10^5 \pm 0,49 \times 10^5$ ), die an Tag 7 ebenfalls nahezu unverändert blieb ( $2,11 \times 10^5 \pm 0,39 \times 10^5$ ) (Abbildung 14 mittig, Abbildung 15 mittig).

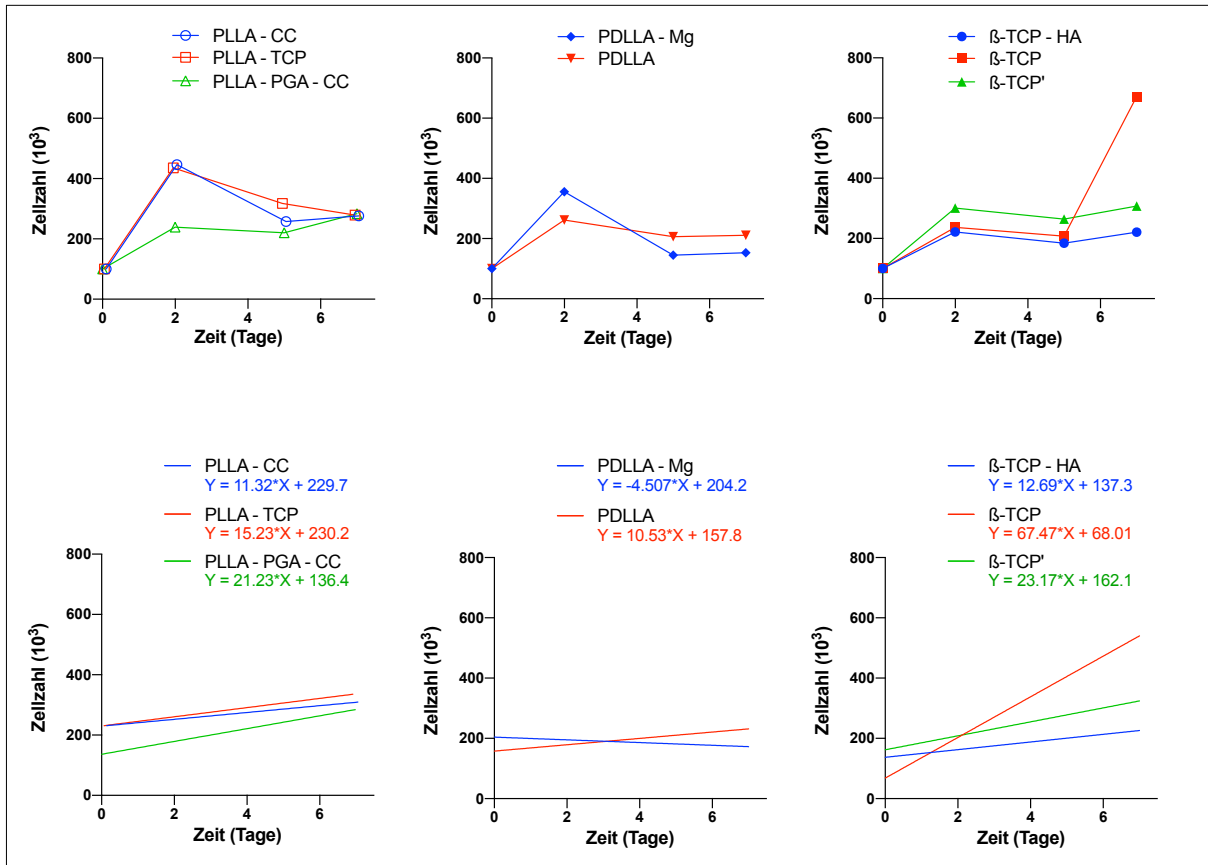
Nach Tag 2 mit  $2,22 \times 10^5 (\pm 0,37 \times 10^5)$  Zellen kam es bei  $\beta$ -TCP-HA an Tag 5 zu einer leichten Abnahme der Zellzahl ( $1,84 \times 10^5 \pm 0,37 \times 10^5$ ), die an Tag 7 wieder leicht anstieg ( $2,21 \times 10^5 \pm 0,52 \times 10^5$ ).  $\beta$ -TCP' zeigte einen ähnlichen Verlauf mit  $3,01 \times 10^5 (\pm 1,82 \times 10^5)$  Zellen an Tag 2, einem leichten Abfall an Tag 5 ( $2,64 \times 10^5 \pm 0,72 \times 10^5$ ) sowie einer Zunahme an Tag 7 ( $3,08 \times 10^5 \pm 0,44 \times 10^5$ ), die signifikant war verglichen mit Tag 5 ( $p < 0,05$ ).  $\beta$ -TCP zeigte  $2,37 \times 10^5 (\pm 0,52 \times 10^5)$  Zellen an Tag 2, einem minimalen Abfall an Tag 5 ( $2,08 \times 10^5 \pm 0,47 \times 10^5$ ) sowie eine signifikante Zunahme an Tag 7 ( $6,72 \times 10^5 \pm 5,88 \times 10^5$ ) verglichen mit Tag 5 ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 14 unten, Abbildung 15 rechts).

Bei den Ausgleichsgeraden (Abbildung 15 unten) zur Bestimmung der Wachstumstendenz wiesen PLLA-PGA-CC,  $\beta$ -TCP und  $\beta$ -TCP' die größte Steigung ( $> 20$ ) auf. Die Steigung der Ausgleichsgerade von PDLLA-Mg war negativ (-4,51).

Zusammenfassend zeigten die Materialien PLLA-PGA-CC,  $\beta$ -TCP und  $\beta$ -TCP' eine signifikante Zunahme der Zellzahl sowie die größte Steigung der Ausgleichsgeraden über den Beobachtungszeitraum. Die anderen Materialien zeigten lediglich nicht signifikante Änderungen oder fallende Zellzahlen.



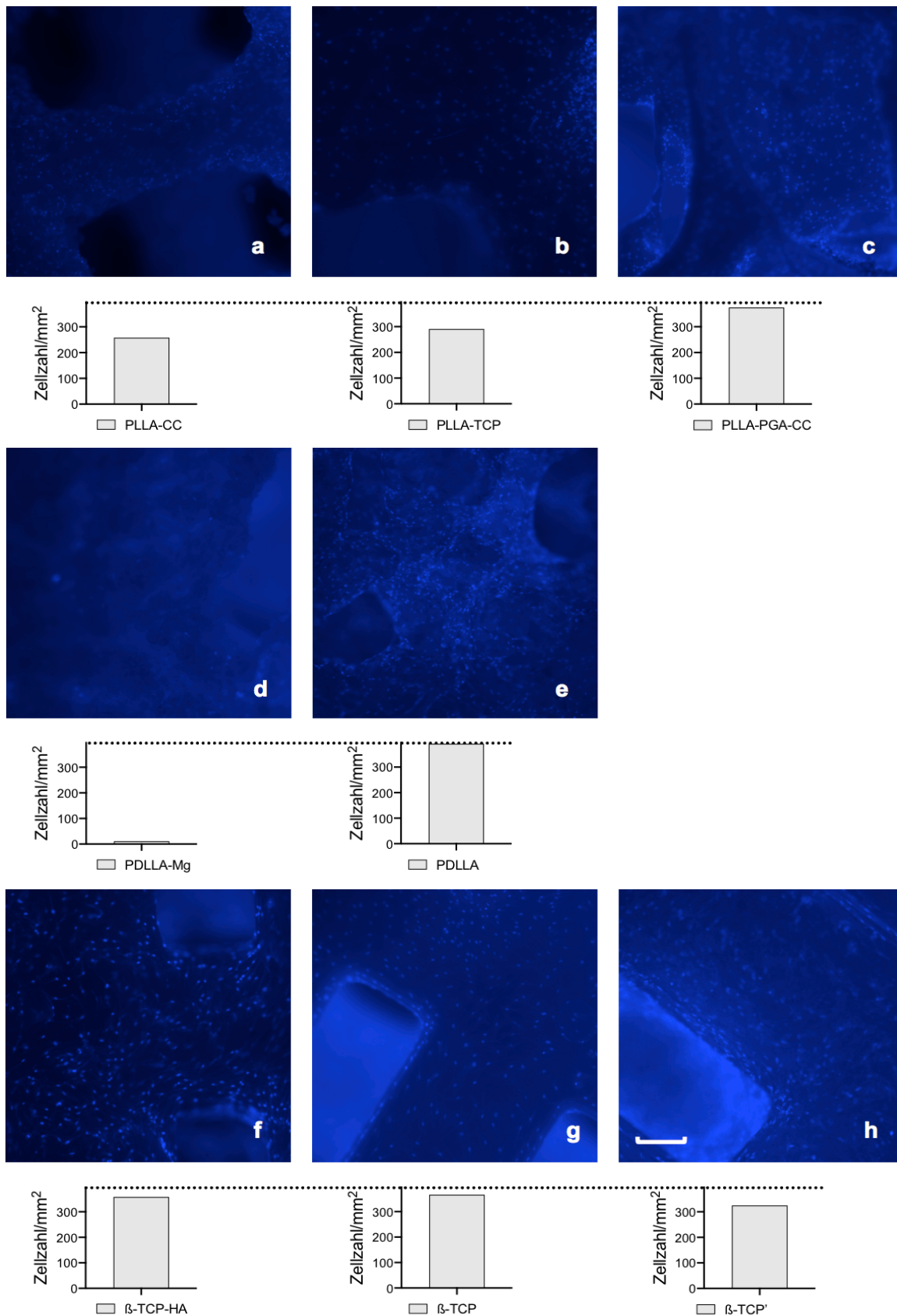
**Abbildung 14.** Sulfhodamin B Assay der einzelnen Materialien. Bestimmung der Zellzahl der im Milieu der Scaffolds wachsenden Osteoblasten nach 2, 5 und 7 Tagen. \* : Statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 15.** Sulforhodamin B Assay. Bestimmung der Zellzahl der im Milieu der Scaffolds wachsenden Osteoblasten nach 2, 5 und 7 Tagen (oben). Ausgleichsgeraden zur Bestimmung der Wachstumstendenz (unten).

### 3.5 Fluoreszenzmikroskopie

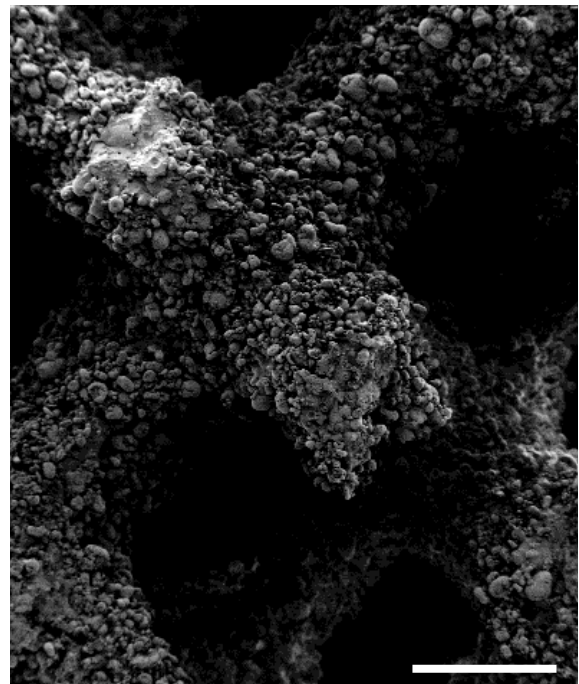
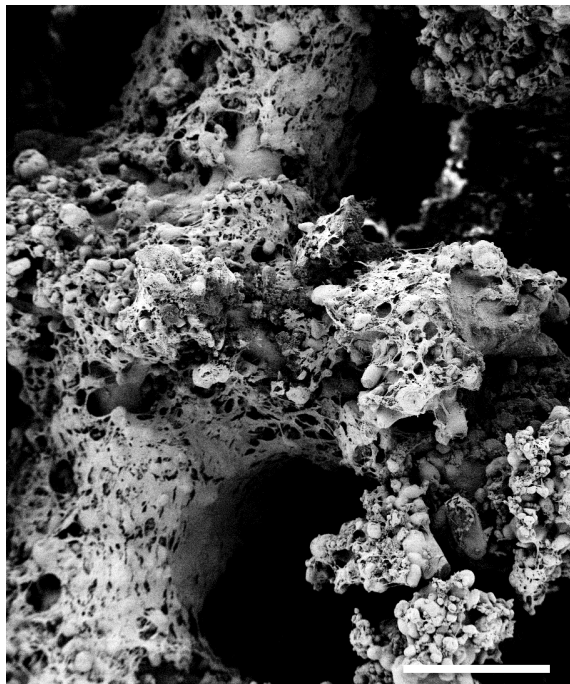
Die höchste Zelldichte auf der Scaffold-Oberfläche zeigten PDLLA (391,7 Zellen/mm<sup>2</sup>), PLLA-PGA-CC (375 Zellen/mm<sup>2</sup>), sowie  $\beta$ -TCP (366,7 Zellen/mm<sup>2</sup>),  $\beta$ -TCP-HA (358,3 Zellen/mm<sup>2</sup>) und  $\beta$ -TCP' (325 Zellen/mm<sup>2</sup>) (Abbildung 16, e, c, g, f, h). Bei PLLA-TCP wurden 291,7 Zellen/mm<sup>2</sup> und bei PLLA-CC wurden 258,3 Zellen/mm<sup>2</sup> ausgezählt (Abbildung 16, b, a). Die niedrigste Oberflächenbesiedlung wies PDLLA-Mg auf (11,1 Zellen/mm<sup>2</sup>) (Abbildung 16, d).



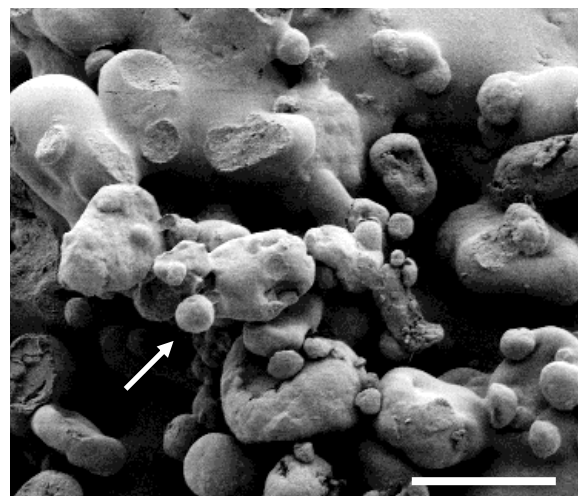
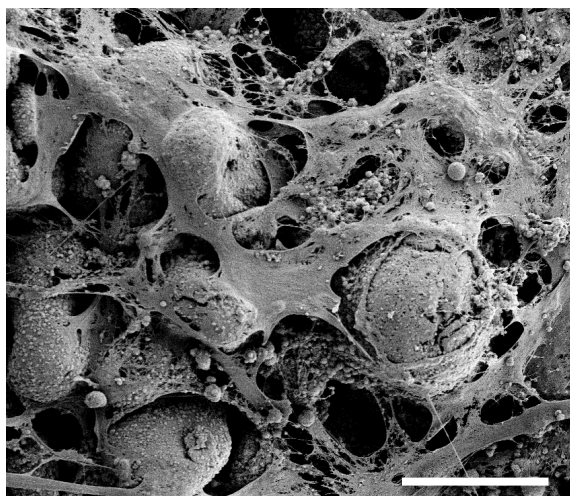
**Abbildung 16.** Fluoreszenzmikroskopie der Scaffoldoberfläche mit Hoechst Staining Solution an Tag 21 nach Besiedlung. Die Oberflächenbesiedelung wurde mittels Zellauszählung beurteilt. Die gepunktete Linie entspricht dem Höchstwert von Poly-D,L-lactid acid (PDLLA) mit 391,7 Zellen/mm<sup>2</sup>. a: Poly-L-lactid acid-Calciumcarbonat (PLLA-CC), b: Poly-L-lactid acid-Tricalciumphosphat (PLLA-TCP), c: Poly-L-lactid acid-Polyglycolic acid-Calciumcarbonat (PLLA-PGA-CC), d: Poly-D,L-lactid acid-Magnesium (PDLLA-Mg), e: PDLLA, f:  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit ( $\beta$ -TCP-HA), g:  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP), h:  $\beta$ -Tricalciumphosphat' ( $\beta$ -TCP'). Maßstabsleiste = 200  $\mu$ m.

### 3.6 Rasterelektronenmikroskopie

In den Abbildungen 17 und 18 sind elektronenmikroskopische Aufnahmen des Materials PLLA-CC dargestellt, rechts ist die unbesiedelte Materialstruktur zu sehen. Bei PLLA-CC ließ sich eine unregelmäßige poröse Oberfläche mit größeren PLLA-Körnern sowie kleineren, etwa 10 µm großen CC-Partikeln erkennen. Das besiedelte Material (Abbildung 18 links) zeigte flächig ausgebreitete Zellen mit langen verzweigten Zellfortsätzen, mit denen die Zellen untereinander und mit dem Material in Verbindung standen.

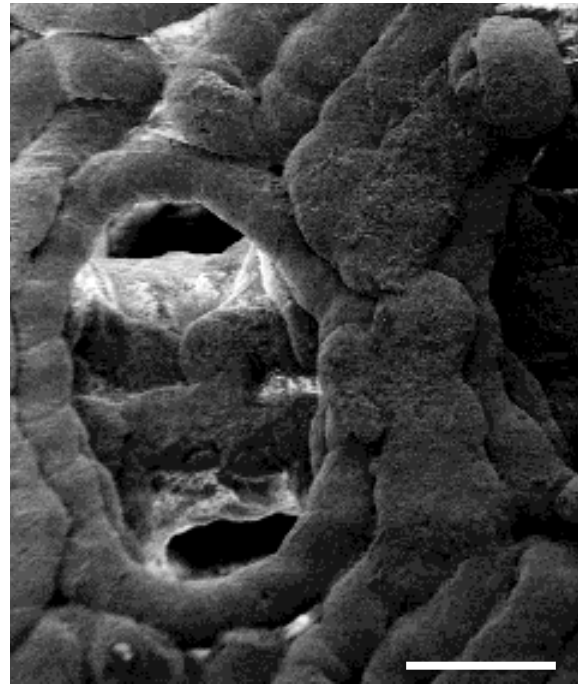
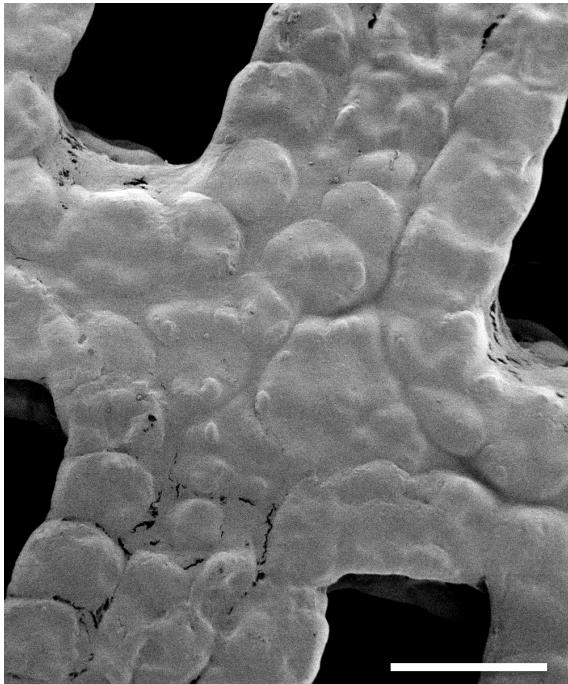


**Abbildung 17.** Rasterelektronenmikroskopie Material Poly-L-lactid acid-Calciumcarbonat (PLLA-CC) Übersichtsaufnahme (30x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 500 µm.

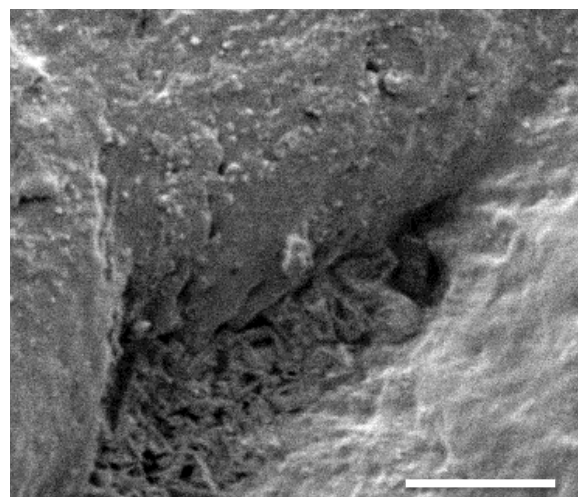
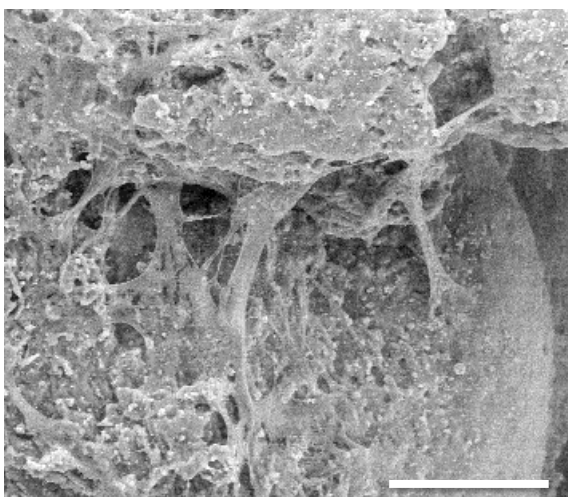


**Abbildung 18.** Rasterelektronenmikroskopie Material Poly-L-lactid acid-Calciumcarbonat (PLLA-CC) (500x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Pfeil = CC-Partikel. Maßstabsleiste = 50 µm.

Bei Material PLLA-TCP waren im nativen Zustand die Makroporen sowie unregelmäßige Einziehungen und kleinere Poren zu erkennen (Abbildungen 19 und 20 rechts). In den Abbildungen links ist das Material nach der Besiedelung mit Osteoblasten dargestellt. Es ließen sich flache Zellen mit Zellfortsätzen erkennen, die sich am Material und in seinen Unebenheiten anhefteten und die Mikroporositäten überspannten (Abbildung 20 links). Über die Zellausläufer standen die Zellen mit anderen Zellen in Kontakt.

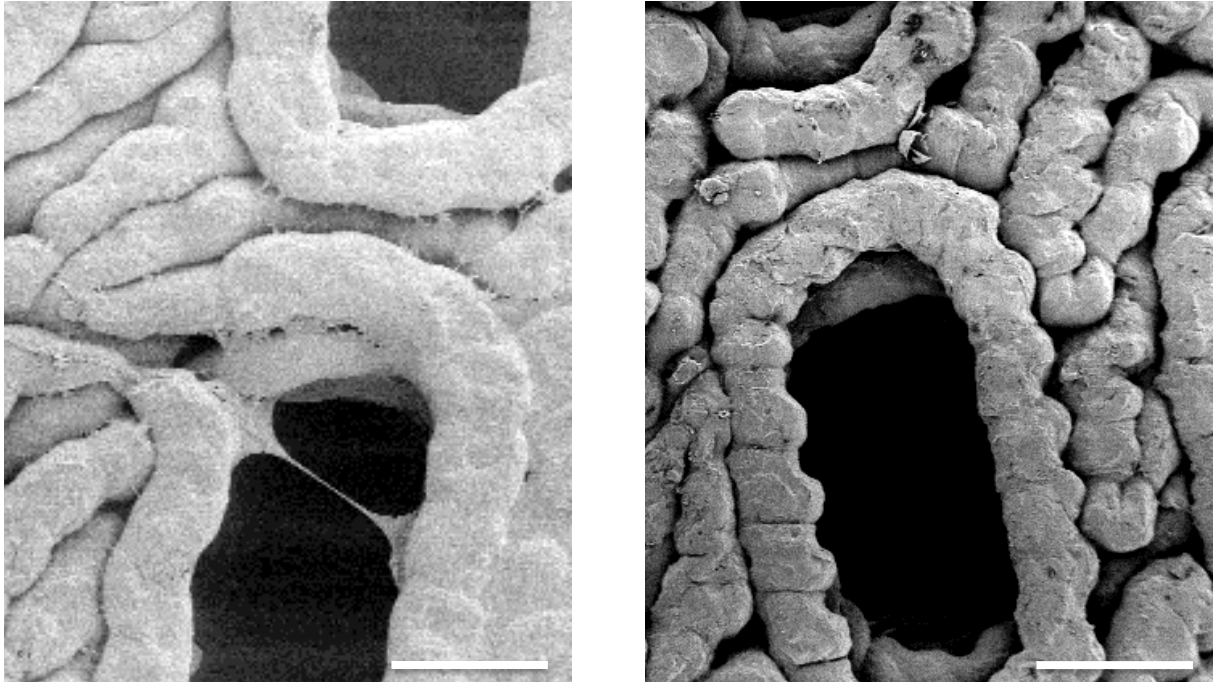


**Abbildung 19.** Rasterelektronenmikroskopie Material Poly-L-lactid acid-Tricalciumphosphat (PLLA-TCP) Übersichtsaufnahme (30x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 500 µm.

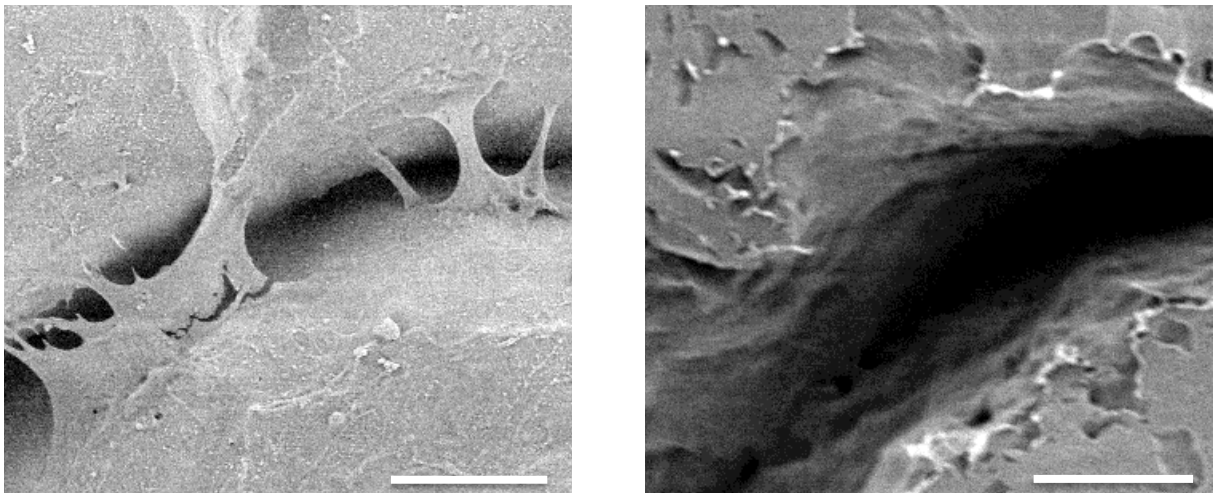


**Abbildung 20.** Rasterelektronenmikroskopie Material Poly-L-lactid acid-Tricalciumphosphat (PLLA-TCP) (500x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 50 µm.

Im unbesiedelten Zustand zeigte das Material PLLA-PGA-CC neben den großen Porenräumen eine poröse Struktur mit Unregelmäßigkeiten und Nischen, was eine gute Adhäsion der Zellen ermöglichte (Abbildung 21 und 22 rechts). Die Zellen befanden sich zwischen den aufgerauten Arealen und standen über ihre Zellfortsätze in Verbindung mit der Materialoberfläche und den Porenrändern (Abbildungen 21 und 22 links).



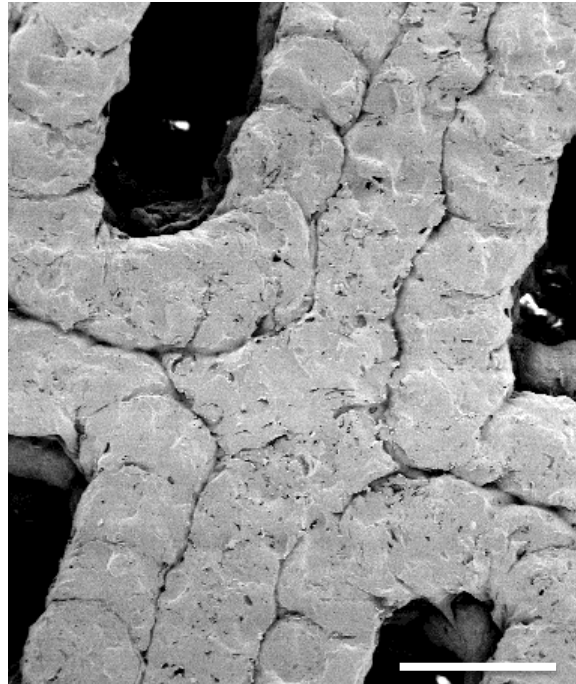
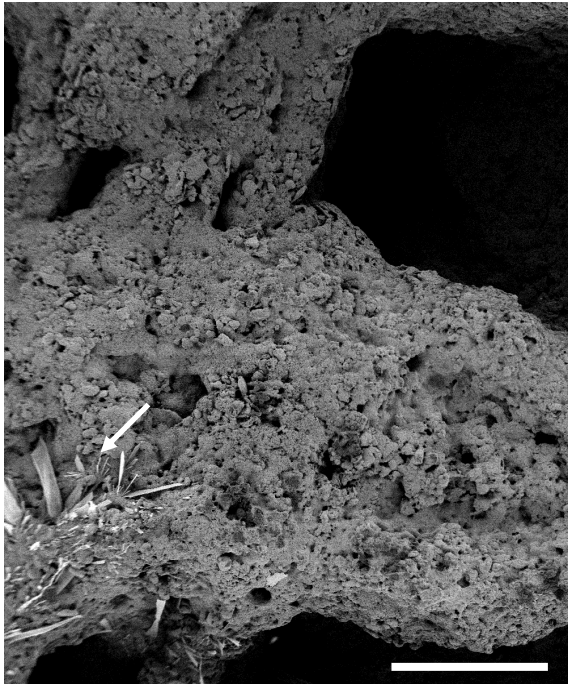
**Abbildung 21.** Rasterelektronenmikroskopie Material Poly-L-lactid acid-Polyglycolic acid-Calciumcarbonat (PLLA-PGA-CC) Übersichtsaufnahme (30x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 500  $\mu\text{m}$ .



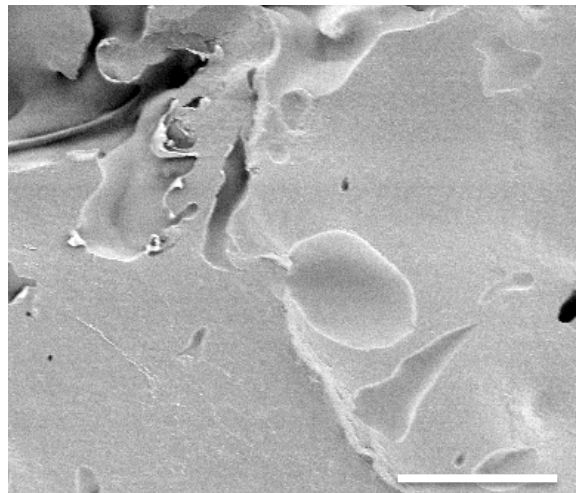
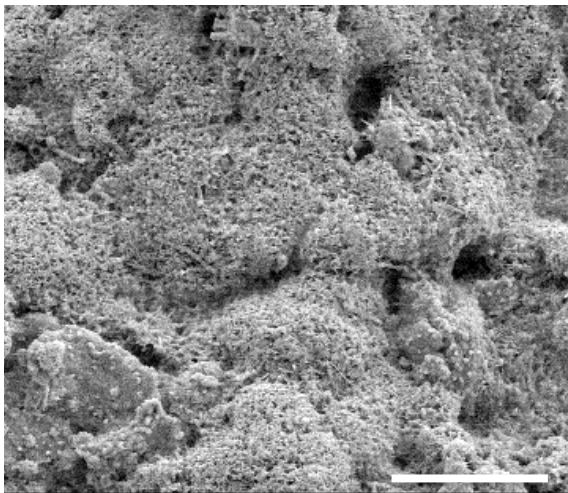
**Abbildung 22.** Rasterelektronenmikroskopie Material Poly-L-lactid acid-Polyglycolic acid-Calciumcarbonat (PLLA-PGA-CC) (500x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 50  $\mu\text{m}$ .



Die Abbildungen 23 und 24 rechts zeigen die ursprüngliche Materialtopografie des PDLLA-Mg-Scaffolds. Makroporen sowie eine unregelmäßige Ausgangsstruktur waren zu sehen. 21 Tage nach der Besiedelung waren keine vitalen Zellen zu erkennen (Abbildung 23 und 24 links). Die Materialstruktur erschien verändert. Bei den kristallförmigen Gebilden handelt es sich vermutlich um Magnesiumhydroxydverbindungen, die aufgrund der Magnesium Degradation entstanden sind (Abbildung 23 links).

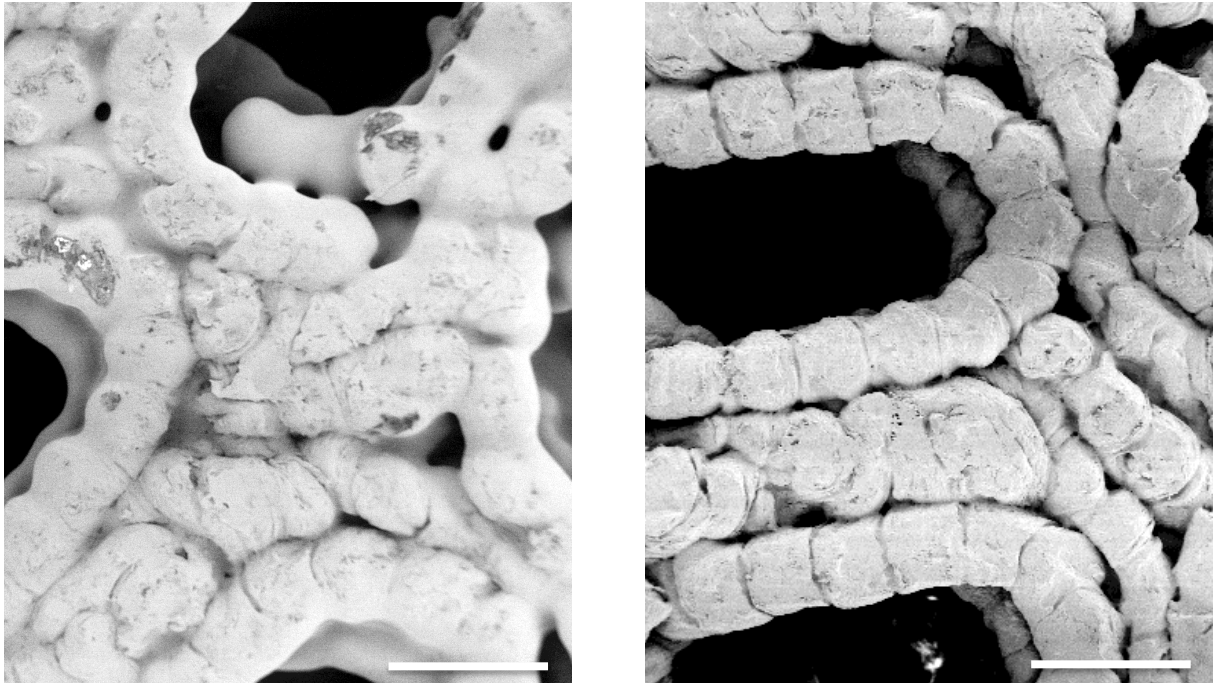


**Abbildung 23.** Rasterelektronenmikroskopie Material Poly-D,L-lactid acid-Magnesium (PDLLA-Mg) Übersichtsaufnahme (30x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Pfeil = Magnesiumhydroxydverbindungen. Maßstabsleiste = 500  $\mu\text{m}$ .

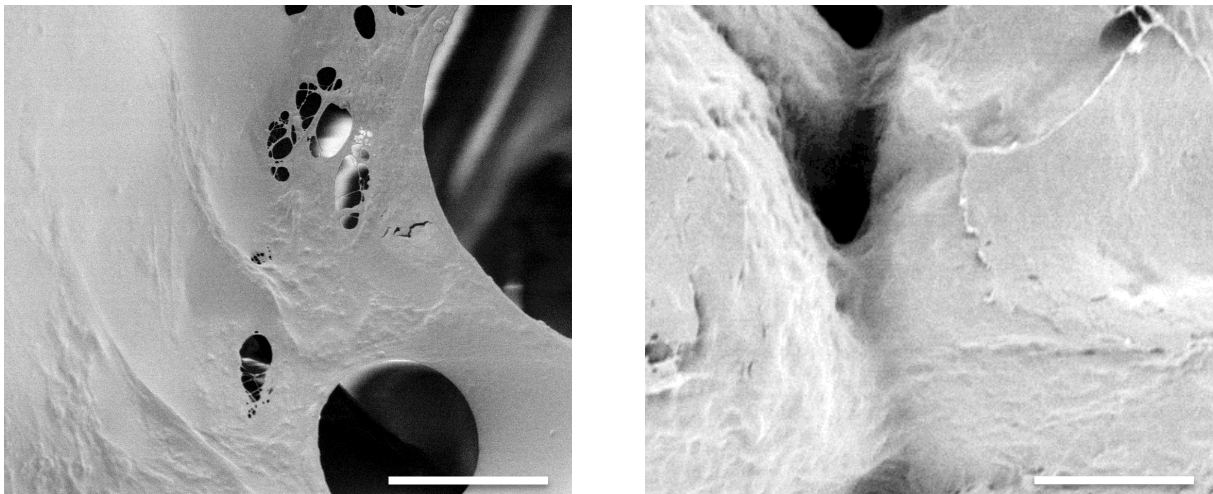


**Abbildung 24.** Rasterelektronenmikroskopie Material Poly-D,L-lactid acid-Magnesium (PDLLA-Mg) (500x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 50  $\mu\text{m}$ .

Beim Material PDLLA waren im unbesiedelten Zustand große Porenräume sowie unregelmäßige Einziehungen und kleinere Poren zu erkennen (Abbildung 25 und 26 rechts). Abbildung 25 und 26 links zeigt das Material nach der Besiedelung mit Osteoblasten. Man erkannte einen Zellrasen mit artifiziellen Einrissen, der sich vom Material abgelöst hat (Abbildung 26 links).

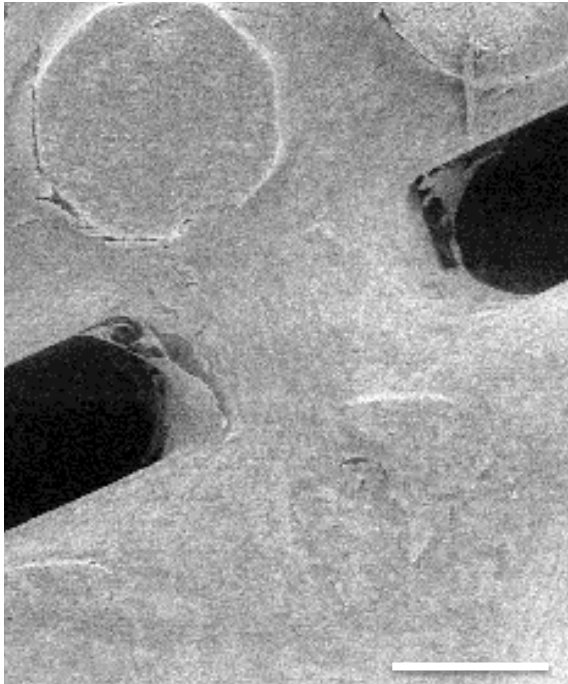


**Abbildung 25.** Rasterelektronenmikroskopie Material Poly-D,L-lactid acid (PDLLA) Übersichtsaufnahme (30x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 500  $\mu\text{m}$ .

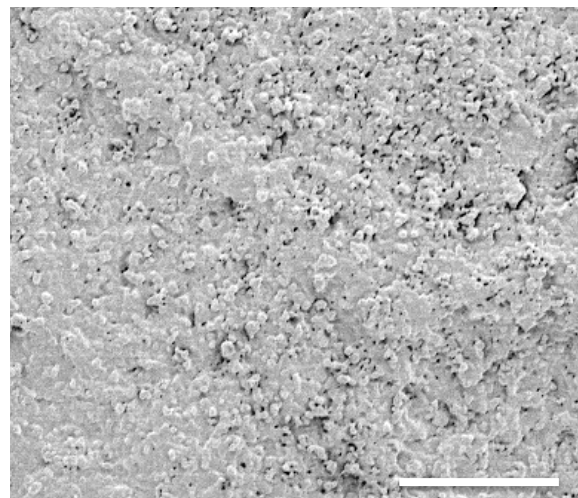
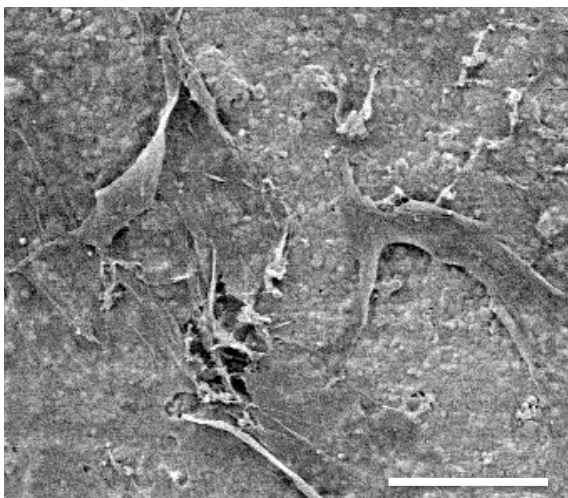


**Abbildung 26.** Rasterelektronenmikroskopie Material Poly-D,L-lactid acid (PDLLA) (500x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 50  $\mu\text{m}$ .

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von  $\beta$ -TCP-HA zeigten in der Nativaufnahme die glatte keramische Oberfläche des Materials (Abbildung 27 rechts). In der 500fachen Vergrößerung ließ sich die Mikrostruktur der Materialoberfläche als flache und feine Körnung erkennen (Abbildung 28 rechts). Links ist jeweils das besiedelte Material abgebildet. Es zeigten sich flache, adhärente Zellen. Über Zellausläufer wiesen sie Kontakt mit der Körnung des Materials auf (Abbildung 28 links).

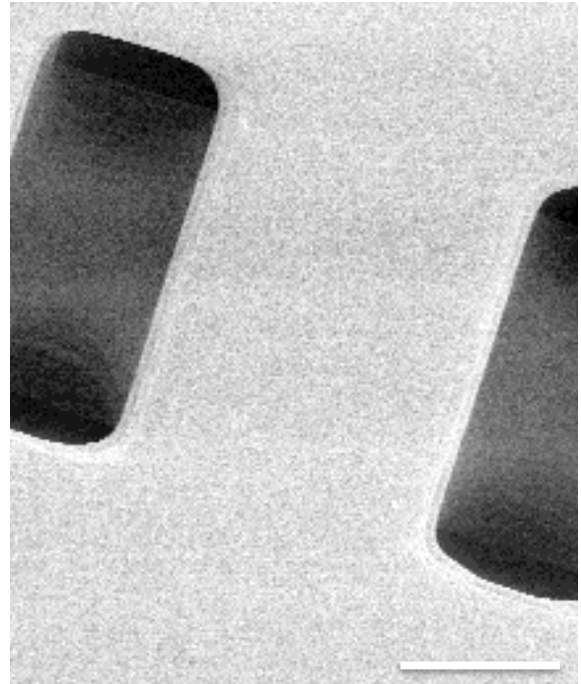
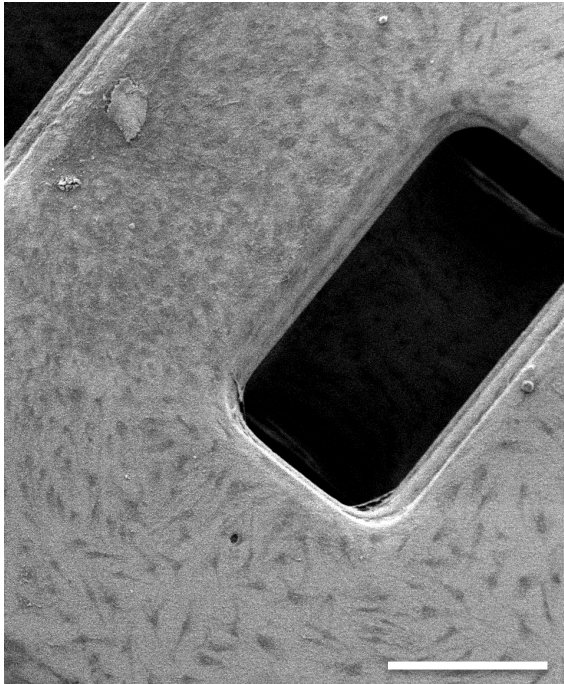


**Abbildung 27.** Rasterelektronenmikroskopie Material  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit ( $\beta$ -TCP-HA) Übersichtsaufnahme (30x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 500  $\mu$ m.

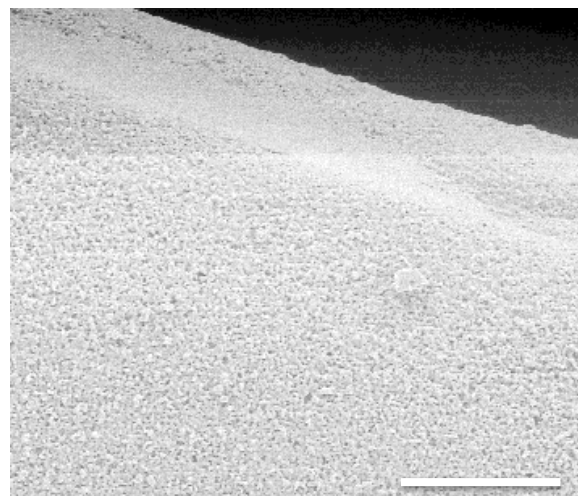
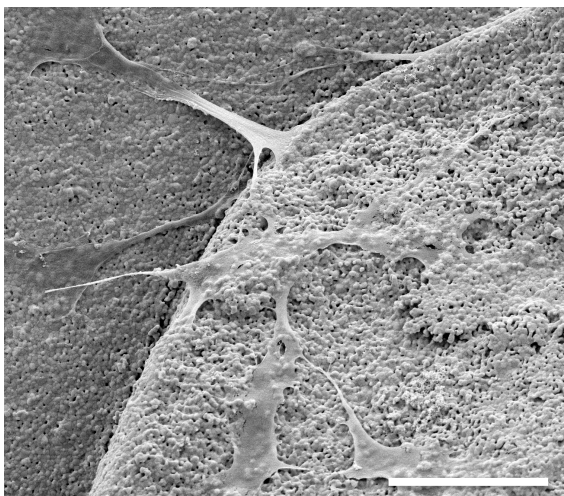


**Abbildung 28.** Rasterelektronenmikroskopie Material  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit ( $\beta$ -TCP-HA) (500x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 50  $\mu$ m.

Die Materialtopografie ist in Abbildung 29 und 30 rechts dargestellt. In der Übersichtsaufnahme war das Makroporensystem gut sichtbar. Das  $\beta$ -TCP-Scaffold zeigte eine glatte Oberfläche mit kaum Unregelmäßigkeiten. In der 500fachen Vergrößerung erschien die feine Körnung des Materials glatt und homogen (Abbildung 30 rechts). Die Aufnahmen des besiedelten  $\beta$ -TCPs zeigten flache, auf dem Material adhärenste Osteoblasten mit ausgestreckten Zellfortsätzen. Mit diesen standen sie mit anderen Zellen und dem Material in Verbindung (Abbildung 30 links).

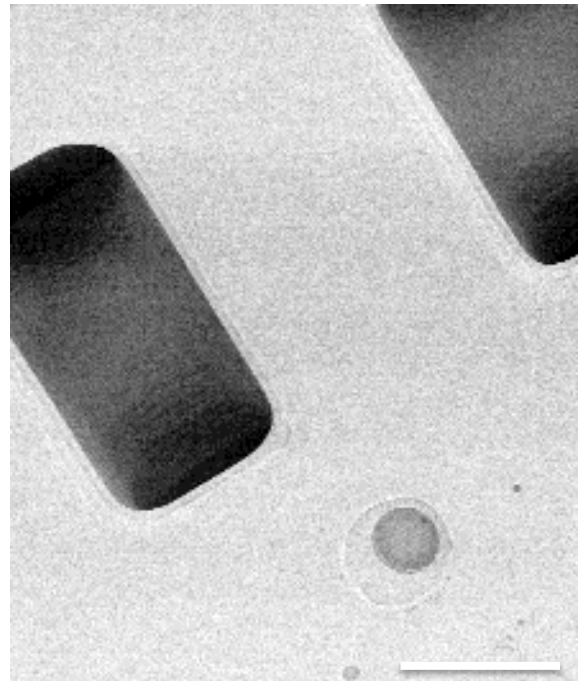
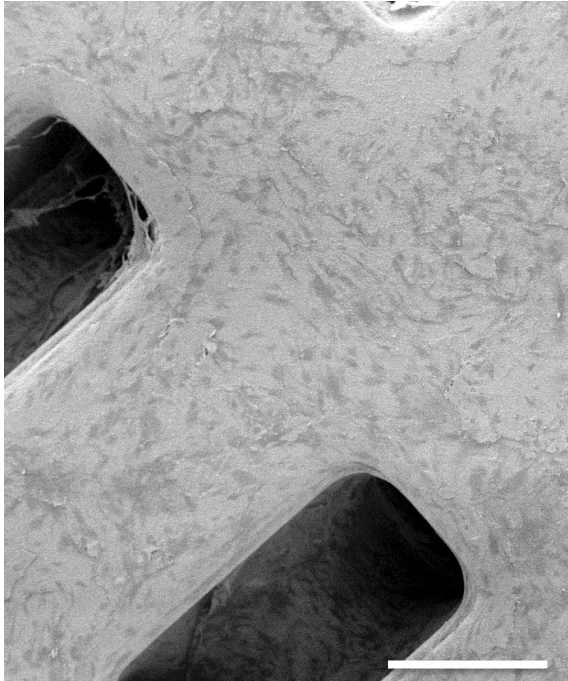


**Abbildung 29.** Rasterelektronenmikroskopie Material  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP) Übersichtsaufnahme (30x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 500  $\mu$ m.

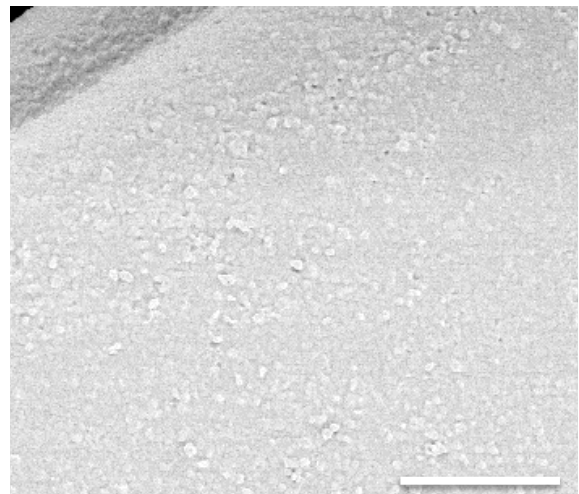
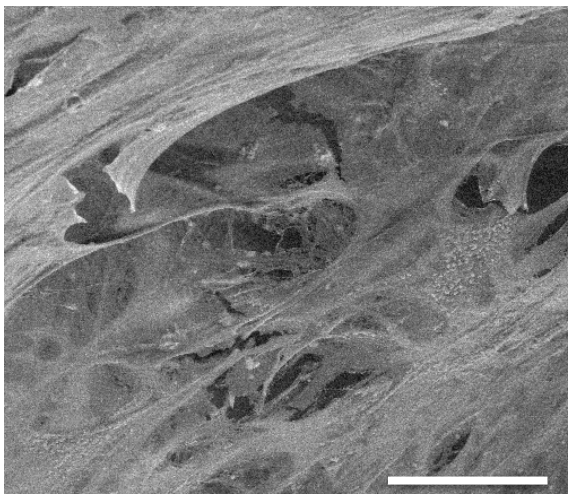


**Abbildung 30.** Rasterelektronenmikroskopie Material  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP) (500x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 50  $\mu$ m.

Im nativen Zustand zeigte  $\beta$ -TCP' wie  $\beta$ -TCP eine glatte regelmäßige Oberfläche (Abbildung 31 rechts) sowie eine homogene fein gekörnte Mikrostruktur (Abbildung 32 rechts). Auf dem Material befanden sich flächig ausgebreitete Osteoblasten, die einen dichten Zellrasen bildeten, in dem artifizielle Einrisse zu sehen waren (Abbildung 32 links).



**Abbildung 31.** Rasterelektronenmikroskopie Material  $\beta$ -Tricalciumphosphat' ( $\beta$ -TCP') Übersichtsaufnahme (30x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 500  $\mu$ m.



**Abbildung 32.** Rasterelektronenmikroskopie Material  $\beta$ -Tricalciumphosphat' ( $\beta$ -TCP') (500x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 50  $\mu$ m.

#### 4. Diskussion

Die Behandlung großer Knochendefekte stellt trotz vielversprechender Ansätze im Bereich des Tissue Engineerings noch immer eine Herausforderung dar (Stevens, 2008). Ein optimales Biomaterial sollte biokompatibel sein und eine kontrollierbare Biodegradierbarkeit, Architektur sowie optimale mechanische Eigenschaften aufweisen (Lee et al., 2014). Gefordert werden ein interkonnektives Porensystem, Porosität und eine optimale Porengröße, worüber es allerdings unterschiedliche Aussagen gibt (Gauthier et al., 1998, Bölgén et al., 2008). Allgemein wird aber eine Porengröße über 300  $\mu\text{m}$  favorisiert (Götz et al., 2004). Wir wählten einen Porendurchmesser von etwa 800  $\mu\text{m}$ , um Osteogenese, Flüssigkeitsaustausch und eine spätere Vaskularisierung zu ermöglichen. Während ein komplexes Scaffold Design mit konventionellen Techniken schwer umsetzbar ist, ist durch additive Verfahren eine individuelle Implantatherstellung möglich (Hollister, 2005, Seitz et al., 2005, Butscher et al., 2011). So war uns sowohl die individuelle Anpassung der Scaffoldform an einen Knochendefekt als auch die Konstruktion der mikroskopischen Scaffoldarchitektur möglich.

In dieser Studie wurde die Biokompatibilität verschiedenster additiv gefertigter Biomaterialien mittels Proliferations-, Apoptose-, Zytotoxizitäts- und Sulforhodamin B Assay sowie Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie evaluiert. So konnten unterschiedlichste Materialien und Materialgruppen objektiv bewertet und verglichen werden. Bei Proliferations- und Apoptose-Assay konnten aufgrund fehlender Zytotoxizität der Assays Mehrfachmessungen über längere Zeiträume vorgenommen werden. Dies hat ebenfalls den Vorteil von besserer Vergleichbarkeit und weniger Ungenauigkeiten. Es wurden humane Osteoblasten verwendet, um Zellen zu verwenden, die auch in der späteren klinischen Anwendung mit den Materialien in Kontakt treten.

TCP-HA wird zu einem immer wichtigeren Biomaterial im Knochen Tissue Engineering. HA spielt aufgrund seiner Ähnlichkeit mit der mineralischen Phase des Knochens eine bedeutende Rolle bei der Zelladhäsion und -proliferation und gehört neben Tricalciumphosphat zu den am häufigsten verwendeten Keramiken (Wang et al., 2010, Dorozhkin, 2012, Krishnamurithy et al., 2013). Auch in-vivo-Studien haben gezeigt, dass die Kombination TCP/HA die Knochenbildung induziert (Kadiyala et al., 1997, Arinzeh et al., 2003, Ho et al., 2016). In dieser Studie zeigte  $\beta$ -TCP-HA einen signifikanten Anstieg der im Scaffold wachsenden Zellen über 21 Tage (Abbildung 8). Sowohl die Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie (Abbildung 28) als auch der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, die eine dichte Oberflächenbesiedelung an Tag 21 zeigten (Abbildung 16), bestätigten diese Beobachtungen. Die Apoptoseaktivität von  $\beta$ -TCP-HA war an Tag 2

signifikant gegenüber den anderen Tagen erhöht, im Verlauf sank sie gegen Null (Abbildung 10). Die anfangs erhöhte Apoptoseaktivität lässt sich bei allen Materialien beobachten und ist am ehesten durch die Trypsinierung und das Passagieren beim Besiedeln der Scaffolds zu erklären. Im weiteren Zeitverlauf (>Tag 2) befanden sich kaum Zellen mehr in der Apoptose, was für die Zellverträglichkeit des Scaffolds spricht. Im Vergleich zu reinem  $\beta$ -TCP war die Apoptoseaktivität/Zellzahl beim TCP-HA an Tag 2 signifikant niedriger. Woo et al. beschreiben eine unterdrückte Zellapoptose durch die Zugabe von HA in Komposit-Scaffolds (Woo et al., 2007). Dies entspricht unseren Ergebnissen. Auch beim Zytotoxizitätstest gemäß ISO10993-5 wurde das Wachstum der Osteoblasten nicht durch den Scaffold-Extrakt beeinträchtigt (Abbildung 11). Der Sulforhodamin B Assay evaluierte die Anzahl an Osteoblasten, die über 7 Tage im Scaffoldextrakt in der unmittelbaren Scaffold-Umgebung wuchsen. Hier zeigten sich gute Ergebnisse, die Ausgleichsgerade des Zellwachstums hatte eine positive Steigung (Abbildung 15). Allerdings war die Gesamt-Zellzahl bei reinem  $\beta$ -TCP und  $\beta$ -TCP' insgesamt noch höher. Trotz sehr guter Biokompatibilität und niedriger Apoptosewerte zeigte TCP-HA bezüglich Zellproliferation und Wachstumsverhalten etwas schlechtere Ergebnisse als  $\beta$ -TCP und  $\beta$ -TCP'.

$\beta$ -TCP gehört zu den am häufigsten verwendeten Biomaterialien. Durch seine Osteokonduktivität, schnelle Abbaubarkeit und Ähnlichkeit mit der Zusammensetzung von Knochen ist es für Knochen Tissue-Engineering besonders geeignet (Kamitakahara, 2008, Banerjee et al., 2010). Dies zeigten auch zahlreiche in-vivo-Studien. Zum Beispiel implantierten Kondo et al. im Rattenmodell  $\beta$ -TCP erfolgreich in den Femurknochen (Kondo et al., 2005).

Die Sprödigkeit des Materials erschwert normalerweise die individuelle Anpassung (Dorozhkin, 2015), welche bei einem individuellen Aufbau mittels additiver Fertigungsverfahren nicht mehr notwendig wird. Da abhängig der Dimension eine klassische Fixation der Keramiken mit Schrauben nicht möglich ist sind alternative Befestigungstechniken notwendig (zum Beispiel ein Cage). Sowohl  $\beta$ -TCP als auch das mechanisch verbesserte  $\beta$ -TCP' mit höherer Biegefestigkeit zeigten einen signifikanten Anstieg der Zellzahl von Tag 2 bis Tag 21. Zudem erreichten beide zusammen mit PDLLA die höchsten Zellzahlen an Tag 14 und 21 verglichen mit allen anderen Materialien und damit eine bessere Zellproliferation. Während  $\beta$ -TCP' einen zweimaligen Zellabfall im Verlauf aufwies, war der Wachstumskurvenverlauf von  $\beta$ -TCP durchweg steigend (Abbildung 9). Unsere guten Ergebnisse im Proliferations Assay für  $\beta$ -TCP und  $\beta$ -TCP' stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie (Abbildung 16, 30 und 32). Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten Osteoblasten mit ausgestreckten Zellfortsätzen, mit denen die Zellen untereinander und mit der Körnung des Materials in Verbindung standen. Die Oberflächenstruktur eines Materials beeinflusst das

Zell- und Proliferationsverhalten. Wiedmann-Al-Ahmad et al. (2005) beschreiben in ihrer Untersuchung zu resorbierbaren Biomaterialien ein besseres Wachstumsverhalten von humanen osteoblastenähnlichen Zellen auf porösen als auf glatten Oberflächen. In den nativen Übersichtsaufnahmen erschien die Oberflächenstruktur der Keramik-Scaffolds glatter als die der restlichen Materialien. Die 500fache Vergrößerung zeigte jedoch die feine Körnung der Materialien, die eine Adhäsion der Osteoblasten begünstigte und trotz der glatten Makrostruktur eine sehr gute Zellbesiedlung zuließ (Abbildung 30 und 32). Die Apoptoseaktivität sank nach anfangs erhöhten Werten (Tag 2) bei  $\beta$ -TCP und  $\beta$ -TCP' im Verlauf gegen Null (Abbildung 10). An Tag 2 war die Apoptoseaktivität/Zellzahl von  $\beta$ -TCP verglichen mit  $\beta$ -TCP' und TCP-HA erhöht. Dies stimmt mit den Ergebnissen des Proliferations Assays überein, bei dem  $\beta$ -TCP an Tag 2 und 5 die niedrigsten Zellzahlen unter den Keramiken aufwies, da die Zellen vermehrt in den programmierten Zelltod gingen. Anschließend stieg die Zellzahl jedoch stetig auf sehr hohe Werte an. Die Osteoblastenproliferation wurde im Zytotoxizität-Assay nicht negativ durch den Extrakt von  $\beta$ -TCP oder  $\beta$ -TCP' beeinflusst, was ebenfalls für eine gute Biokompatibilität spricht (Abbildung 11). Beim Sulforhodamin B Assay konnte an Tag 7 eine höhere Zellzahl bei  $\beta$ -TCP und  $\beta$ -TCP' verglichen mit TCP-HA beobachtet werden. Verglichen mit allen Materialien zeigten sie hier ebenfalls die besten Ergebnisse mit einer Ausgleichsgeraden-Steigung von 67,5 ( $\beta$ -TCP) und 23,2 ( $\beta$ -TCP') (Abbildung 15). Bezüglich Zellproliferation und Wachstumsverhalten zeigten  $\beta$ -TCP und  $\beta$ -TCP' in der Gruppe Keramik-Scaffolds die besten Ergebnisse.

PLLA-CC wurde in der Literatur bereits kürzlich als Knochenersatzmaterial beschrieben (Gayer et al., 2019). Calciumcarbonat wirkt sich beim Knochen Tissue Engineering vorteilhaft aus, da extrazelluläres Calcium die osteogene Genexpression verstärkt und die Knochenregeneration fördert (Aquino-Martínez et al., 2017). Calciumcarbonat wurde bereits früher als geeigneter Füllstoff für Polyester erwähnt, da es durch seine pH-stabilisierende Wirkung den sauren Abbau von Polylactiden puffert (Schiller und Epple, 2003). In dieser Studie zeigte PLLA-CC zwar einen signifikanten Anstieg der im Scaffold wachsenden Zellen von Tag 2 auf Tag 21 (Abbildung 8), doch war die Zellzahl zu allen Messzeitpunkten etwas niedriger als die der anderen PLLA-basierten Scaffolds. Die Apoptoseaktivität war anfänglich (Tag 2) signifikant erhöht, im Verlauf sank sie gegen Null (Abbildung 10), was für die langfristige Zellverträglichkeit des Scaffolds spricht. Die erhöhte Apoptoseaktivität hängt vermutlich mit Unterschieden in der Abbaukinetik und der initialen Wasseraufnahme der polymeren Scaffold-Systeme zusammen. Auch spielen unterschiedliche Proteine als Ablagerung auf den Scaffolds eine Rolle. Auch beim Zytotoxizitätstest wurde das Wachstum der Osteoblasten nicht durch den Scaffold-Extrakt beeinträchtigt (Abbildung 11). Im



Sulforhodamin B Assay unterschied sich die Zellzahl an Tag 7 kaum von den anderen PLLA-Scaffolds. Allerdings zeigte der Kurvenverlauf die geringste Steigung der Ausgleichsgerade innerhalb der PLLA-Scaffolds (Abbildung 15). Gayer et al. beschrieben eine gute Zellkompatibilität von PLLA-CC, allerdings fehlen hier die Vergleichsmöglichkeiten mit anderen Materialien (Gayer et al., 2019). In dieser Studie zeigte PLLA-CC insgesamt eine gute Biokompatibilität. Im Vergleich mit den Poly-L-lactiden PLLA-TCP und PLLA-PGA-CC sind diese allerdings hinsichtlich Zellproliferation und Wachstumsverhalten als noch vielversprechender zu bewerten.

Komposite Scaffolds aus PLLA-TCP sind beim Knochen Tissue Engineering häufig verwendete Biomaterialien (Daculsi et al., 2011, Johnson, 2011, Delabarde et al., 2012, Perez, 2013, Lee et al., 2013). Ziel ist es durch Kombination von PLLA und TCP die Unzulänglichkeiten der einzelnen Materialien zu überwinden. TCP wirkt zum einen dem sauren Milieu entgegen, das aus dem Polylactidabbau resultiert. Zum anderen verbessert die Kombination von PLLA und TCP die mechanischen Eigenschaften eines Scaffolds (Wang et al., 2010, Wagoner et al., 2011). Es konnte ein nicht signifikanter Anstieg der im Scaffold wachsenden Zellen von Tag 2 auf Tag 21 beobachtet werden, der Anstieg von Tag 14 auf Tag 21 war signifikant (Abbildung 8). Die Zellzahl war im Zeitverlauf höher als bei PLLA-CC, aber niedriger als bei PLLA-PGA-CC. Auch bei PLLA-TCP war die Apoptoseaktivität an Tag 2 signifikant erhöht, im Verlauf ging sie ebenfalls gegen Null (Abbildung 10). Die Ergebnisse im Zytotoxizitätstest spiegelten das Fehlen zytotoxischer Komponenten wider (Abbildung 11). Im Sulforhodamin B Assay unterschied sich die Zellzahl an Tag 7 kaum von den anderen PLLA-Scaffolds. Allerdings fielen die Zellzahlen nach einem Anstieg an Tag 2 wieder ab und die Ausgleichsgerade zeigte eine etwas geringere Steigung als PLLA-PGA-CC (Abbildung 15).

PLLA-PGA-CC wurde in dieser Zusammensetzung in der Literatur noch nicht als Knochenersatzmaterial beschrieben. Das Poly(L-lactid) PLLA wird beim Tissue Engineering für die Regeneration von Knochengewebe bereits weithin verwendet (Locs et al., 2015, Narayanan et al., 2016, Chen et al., 2017, Kaliva et al., 2020). Polyglycolic acid (PGA) ist ein weniger hydrophobes Polymer mit einer relativ schnellen Abbaurate (Gentile et al., 2014). Das Copolymer PLLA-PGA wurde zur bioresorbierbaren Osteofixation in Form von Schrauben, Platten oder Orbitaboden-Rekonstruktionsplatten beschrieben (Eppley und Reilly, 1997, Pietrzak und Eppley 2006, Lin et al., 2014, Kim und Lee, 2019). Auch finden sich Angaben zur guten Biokompatibilität des Komposits poly(lactic-co-glycolic) acid-Calciumcarbonat (PLGA-CC), nicht aber zu PGA-CC oder PLLA-PGA-CC (Cheng et al., 2013). PLGA weist als Copolymer von PGA zum Teil ähnlichen Eigenschaften auf. Bei unseren Untersuchungen zeigte sich beim PLLA-PGA-CC ein signifikanter Anstieg des Zellmetabolismus von Tag 2 bis 21 (Abbildung 8). Die Zellzahl der im Scaffold wachsenden

Osteoblasten war an allen Messtagen gegenüber den anderen PLLA-basierten Scaffolds erhöht. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an Tag 21 bestätigten diese Beobachtungen, PLLA-PGA-CC wies die stärkste Oberflächenbesiedlung unter den PLLA-Scaffolds auf (Abbildung 16). In der elektronenmikroskopischen Untersuchung waren auf allen PLLA-basierten Scaffolds Zellen nachweisbar, die über Zellausläufer mit dem Material in Kontakt standen und die Mikroporositäten überspannten (Abbildung 18, 20 und 22). Die unregelmäßige Oberflächenbeschaffenheit mit großen Porenräumen sowie unregelmäßigen Einziehungen und kleineren Poren ermöglichte eine gute dreidimensionale Zellanheftung. Die porösen Materialunregelmäßigkeiten schienen dabei nicht nachteilig zu sein, sondern vielmehr als Leitschiene zu fungieren. Bei PLLA-PGA-CC sank die Apoptoseaktivität nach anfangs erhöhten Werten (Tag 2) im Verlauf gegen Null, was wünschenswert ist (Abbildung 10). Zudem zeigte es mitunter die niedrigsten Apoptosewerte/Zellzahl im Vergleich mit allen Materialien, was auf eine gute Zellverträglichkeit hindeutet. Auch beim Zytotoxizitätstest beeinträchtigte der Scaffold-Extrakt das Wachstum der Osteoblasten nicht (Abbildung 11). Bei der Evaluation der Zellzahl im Sulforhodamin B Assay war die Zellzahl an Tag 7 etwa genauso hoch wie bei den anderen PLLA-Scaffolds. Allerdings wies PLLA-PGA-CC hier als einziges Material einen signifikanten Anstieg der Zellzahl im Verlauf sowie die größte Steigung der Ausgleichsgeraden auf (Abbildung 14 und 15). Bezüglich Zellproliferation, Wachstumsverhalten und Apoptoseaktivität zeigte PLLA-PGA-CC in der Gruppe der Poly-L-lactide die besten Ergebnisse.

PDLLA-Mg in dieser Zusammensetzung und Magnesium in dieser Verarbeitungsweise wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben. Um technische Machbarkeit zu erreichen, wurde technisch reines Magnesium verwendet. Magnesium wird aufgrund seiner biologischen Abbaubarkeit, und seiner Fähigkeit zur Förderung der Knochenneubildung großes Potential im Bereich des Knochen Tissue Engineerings zugeschrieben. Zudem ist das Elastizitätsmodul von Magnesium mit dem des kortikalen Knochens vergleichbar (Staiger et al., 2006, Walker et al., 2014, Yoshizawa et al., 2014, Zheng et al., 2014, Diaz-Tocados et al., 2017). Problematisch ist allerdings die schnelle Korrosion von Magnesium, die zu einem Verlust der Struktur und einer Freisetzung von Abbauprodukten führen kann (Yazdimamaghani et al., 2017). Die Abbaurate von technisch reinem Magnesium ist sehr schnell. Unsere Absicht bestand darin eine polymere Matrix um das Mg-Material zu generieren, um die Abbaugeschwindigkeit zu reduzieren und die Zellkompatibilität zu erhöhen. Unsere Ergebnisse im Proliferations Assay zeigten eine niedrige Zellzahl auf den Scaffolds (Abbildung 8). Dies bestätigten auch unsere fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Tag 21, auf denen kaum Zellen zu finden waren (Abbildung 16, 23 und 24). Die Apoptoseaktivität/Zellzahl war insbesondere an Tag 7

signifikant erhöht verglichen mit den anderen Materialien (Abbildung 10). Der hohe Wert lässt sich durch die extrem niedrige Zellzahl auf dem Scaffold erklären und von diesen wenigen Zellen befand sich ein großer prozentualer Anteil in Apoptose. Die hohen Apoptosewerte stehen in Einklang mit den niedrigen Zellzahlen. Auch im Sulforhodamin B Assay war die Zellzahl im Verlauf niedriger als die der anderen Materialien und die Ausgleichsgerade war fallend mit einer Steigung von -4,5 (Abbildung 15). Im Gegensatz dazu wurde die Osteoblastenproliferation durch die Extrakte nicht negativ beeinflusst und ließ auf ein Fehlen zytotoxischer Komponenten schließen (Abbildung 11). Auch Tavares et al. berichteten von fehlender Zytotoxizität Magnesium-versetzter Komposite Scaffolds bei der Zytotoxizität Testung gemäß ISO10993 (Tavares et al. 2013). Dies verdeutlicht wie wichtig die Prüfung des Werkstoffes selbst und nicht nur die Prüfung eines daraus hergestellten Eluates ist, da hier Auswirkungen der Scaffoldarchitektur sowie andere Wechselwirkungen vernachlässigt werden. PDLLA-Mg zeigte in dieser Studie verglichen mit den anderen PDLLA-basierten Materialien weniger gute Ergebnisse. Auch in Zusammenschau aller Materialien schnitten die übrigen Materialien besser ab. Dies ist voraussichtlich auf die Freisetzung von Abbauprodukten wie Mg-Ionen, Hydroxylionen und Wasserstoffgas zurückzuführen (Yazdimamaghani et al., 2017) und war bei reinem Magnesium zu erwarten. Es ist anzunehmen, dass die Verlangsamung des Abbaus, die wir durch die Polymerbeschichtung erreichen wollten in zu geringem Maße stattgefunden hat. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen 21 Tage nach Zellbesiedelung lässt sich ein Verlust der Oberflächenstruktur bereits erkennen (Abbildung 23 und 24). Wir konnten dennoch zeigen, dass die additive Fertigung Magnesium-basierter Implantate technisch machbar ist. Weitere Studien zur Optimierung des Biomaterials sind notwendig, um das Potential des Materials fürs Knochen Tissue Engineering voll ausschöpfen zu können.

PDLLA wurde bereits vielfach als Biomaterial beschrieben (Heidemann et al., 2001, Epple, 2003, Schiller und Epple, 2003, Backhaus et al., 2013). Die Zellzahl der im Scaffold wachsenden Osteoblasten nahm bis zu Tag 21 stetig zu und war an den Messtagen 5, 7, 14 und 21 gegenüber PDLLA-Mg erhöht. PDLLA zeigte an Tag 21 die höchsten Werte verglichen mit allen untersuchten Scaffolds (Abbildung 9). Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie bestätigten diese Beobachtung, 21 Tage nach Besiedelung zeigte PDLLA die dichteste Oberflächenbesiedelung (Abbildung 16). Elektronenmikroskopisch war ein dichter Zellrasen zu beobachten, der sich vom Material abgelöst hat (Abbildung 26). Ein Ablösen der Osteoblasten vom Scaffold kann durch einen konfluenten Zellrasen und ein damit verbundenes Loslösen der Zellen vom Material bedingt sein oder artifiziell (beispielsweise durch Fixierschritte) entstehen. Bei der Untersuchung der Apoptoseaktivität sank diese nach anfangs stark erhöhten Werten (Tag 2) im Verlauf gegen Null (Abbildung 10). Auch beim Zytotoxizitätstest war das Wachstum der Osteoblasten durch die Scaffold-

Extrakte nicht beeinträchtigt (Abbildung 11). Bei der Evaluation der Zellzahl im Sulforhodamin B Assay war die Zellzahl an Tag 5 und 7 gegenüber PDLLA-Mg erhöht. Außerdem wies PDLLA die größte Steigung der Ausgleichsgeraden innerhalb der Poly-D,L-lactide auf (Abbildung 15). Bezüglich Zellproliferation, Wachstumsverhalten und Apoptoseaktivität zeigte PDLLA in der Gruppe der Poly-D,L-lactide die besten Ergebnisse.

In dieser Studie wurde die Biokompatibilität verschiedener im Reinraum additiv gefertigter Biomaterialien evaluiert. So konnten unterschiedliche Materialien objektiv bewertet und verglichen werden. In Zusammenschau aller Materialien haben sich die Keramik-basierten Scaffolds in-vitro als am vielversprechendsten herausgestellt. Sie zeigten im Proliferations Assay sehr hohe Zellzahlen. Ihre in-vitro Zytotoxizität ist als nicht zytotoxisch einzuschätzen und die Apoptoseaktivität nimmt über den Messzeitraum stark ab. Besonders gute Ergebnisse zeigten  $\beta$ -TCP und  $\beta$ -TCP', die auch im Sulforhodamin B Assay die steilsten Wachstumskurven aufwiesen. Innerhalb der Poly-L-lactide schnitt PLLA-PGA-CC bezüglich Zellproliferation, Wachstumsverhalten und Apoptoseaktivität am besten ab. In der Gruppe der Poly-D,L-lactide zeigte PDLLA die besten Ergebnisse.

Die im Vergleich niedrigsten Zellzahlen und höchsten Apoptosewerte waren bei PDLLA-Mg zu beobachten. Hier sind weitere Studien zur Verbesserung der Materialien geplant, da auch diese Materialien durchaus vielversprechende Eigenschaften aufweisen, die für Tissue Engineering Ansätze genutzt werden sollten.

Es sollte berücksichtigt werden, dass in-vitro andere Bedingungen als in-vivo gegeben sind. In-vitro Ergebnisse können nicht immer exakt auf die in-vivo Situation übertragen werden. Im Hinblick auf das Verhalten der Materialien in-vivo sind als nächster Schritt weiterführende Studien am Großtiermodell Schaf geplant, um die vielversprechendsten Materialien auf ihre Eignung zur Regeneration von Knochendefekten zu untersuchen.

## Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Große Knochendefekte wurden bisher vor allem mit autogenen Knochentransplantaten behandelt. Aufgrund von begrenzter Verfügbarkeit und Hebedefektmorbidität wird kontinuierlich an der Entwicklung verschiedener Knochenersatzmaterialien geforscht. Ein Vorteil synthetisch hergestellter Implantate ist zudem die Möglichkeit der individuellen Anpassung patientenspezifischer Implantate. So können die Materialien entsprechend des zu versorgenden Knochendefekts individuell dimensioniert werden. Insbesondere Keramiken und Polymere wurden vielfach untersucht, allerdings sind bisher nicht alle Materialien standardisiert und patientenspezifisch fertigbar. Auch ist die Vergleichbarkeit der Biomaterialien untereinander durch die unterschiedliche Methodik verschiedener Studien begrenzt.

In dieser Studie wurde ein breites Spektrum an Materialien untersucht, die alle im Reinraum mit standardisierten Techniken mittels Digital-Light-Processing, Selective-Laser-Sintering und Fused-Deposition-Modeling additiv fertigbar und individuell dimensionierbar sind. Die Materialien Poly-L-lactid acid - Calciumcarbonat (PLLA-CC), Poly-L-lactid acid - Tricalciumphosphat (PLLA-TCP), Poly-L-lactid acid - Polyglycolic acid - Calciumcarbonat (PLLA-PGA-CC), Poly-D,L-lactid acid - Magnesium (PDLLA-Mg), Poly-D,L-lactid acid (PDLLA),  $\beta$ -Tricalciumphosphat - Hydroxylapatit ( $\beta$ -TCP-HA) und  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP und  $\beta$ -TCP') wurden bezüglich ihrer Biokompatibilität objektiv miteinander verglichen. Hierzu wurden die Konstrukte mit humanen Osteoblasten besiedelt und 21 Tage lang in-vitro kultiviert. Anschließend wurde das Verhalten der Zellen auf den dreidimensionalen Scaffolds analysiert. Es wurden humane Osteoblasten verwendet, um Zellen zu verwenden, die auch in der späteren klinischen Anwendung mit den Materialien in Kontakt treten. Proliferationsverhalten und Apoptoseaktivität der Osteoblasten wurden evaluiert und das Zellwachstum auf den Materialien fluoreszenz- sowie rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Zudem wurde das Zellwachstum bei indirektem Materialkontakt bestimmt und ein Zytotoxizitäts Assay als weiterer Parameter für die Biokompatibilitätsprüfung der Materialien verwendet.

In Zusammenschau aller Materialien zeigten insbesondere die Keramik-basierten Scaffolds gute Ergebnisse mit sehr hohen Zellzahlen im Proliferations-Assay sowie schnell abfallenden Apoptoseraten.

Unter den Keramiken zeigten  $\beta$ -TCP und  $\beta$ -TCP' besonders gute Ergebnisse und wiesen auch im Sulforhodamin B Assay die steilsten Wachstumskurven auf. Innerhalb der Poly-L-lactide schnitt PLLA-PGA-CC bezüglich Zellproliferation, Wachstumsverhalten und Apoptoseaktivität am besten ab. In der Gruppe der Poly-D,L-lactide zeigte PDLLA die besten Ergebnisse.

Die im Vergleich niedrigsten Zellzahlen und höchsten Apoptosewerte waren bei PDLLA-Mg zu beobachten. Wir konnten nichtdestotrotz zeigen, dass die additive Fertigung Magnesium-basierter Implantate technisch machbar ist. Hier sind weitere Studien zur Optimierung des Biomaterials geplant, um das Potential des Materials für Knochen Tissue Engineering Ansätze nutzen zu können.

Als nächster Schritt ist die Anwendung im Tierversuch am Großtiermodell geplant, um die vielversprechendsten Materialien auf ihre Eignung für die klinische Anwendung zu untersuchen.

## Abstract

Large bone defects have so far mainly been treated with autogenous bone grafts. Due to limited availability and donor site morbidity, research is ongoing into the development of various bone replacement materials. Another advantage of synthetically manufactured implants is the possibility of patient-specific engineering. Thus, the material can be individually dimensioned according to the bone defect. Ceramics and polymers have been investigated many times, but not all materials can be produced in a standardized and patient-specific way yet. The ability to compare biomaterials with one another is also limited by the different methods used in different studies.

In this study, a wide range of materials was investigated, all of which can be additively manufactured and individually dimensioned in the clean room using standardised techniques using digital light processing, selective laser sintering and fused deposition modelling. The materials Poly-L-lactide acid - calcium carbonate (PLLA-CC), Poly-L-lactide acid - tricalcium phosphate (PLLA-TCP), Poly-L-lactide acid - polyglycolic acid - calcium carbonate (PLLA-PGA-CC), Poly-D, L-lactide acid - magnesium (PDLLA-Mg), poly-D,L-lactide acid (PDLLA),  $\beta$ -tricalcium phosphate - hydroxyapatite ( $\beta$ -TCP-HA) and  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP and  $\beta$ -TCP') were objectively compared with one another with regard to their biocompatibility. For this purpose, the behaviour of human osteoblasts on the three-dimensional scaffolds was analysed using a proliferation assay, an apoptosis assay, fluorescence microscopy and scanning electron microscopy over 21 days. In addition, cell growth was determined upon indirect material contact and a cytotoxicity assay was used as a further parameter for biocompatibility testing.

Good biocompatibility was demonstrated in all groups. In particular, PLLA-PGA-CC, PDLLA and  $\beta$ -TCP showed very high cell counts in the proliferation assay as well as rapidly decreasing apoptosis rates and offers significant potential for use as patient-specific bone replacement implants.

The lowest cell numbers and highest apoptosis levels were observed with PDLLA-Mg. We were able to show, nonetheless, that additive manufacturing of magnesium-based implants is technically feasible. Here, further studies are planned to optimize the biomaterial to exploit its potential for bone tissue engineering approaches.

As a next step, the application in animal experiments on large animal models is planned in order to investigate the most promising materials for their suitability for clinical application.

## Literaturverzeichnis

1. Al Ruhaimi KA. Bone graft substitutes: a comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 16 (2001) 105-114
2. Aquino-Martínez R, Artigas N, Gámez B, Rosa JL, Ventura F. Extracellular calcium promotes bone formation from bone marrow mesenchymal stem cells by amplifying the effects of BMP-2 on SMAD signalling. *PLoS One* 12 (2017) e0178158
3. Arinzeh TL, Peter S, Archambault M, van den Bos C, Gordon S, Kraus K, Smith A, Kadiyala S. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am* 85 (2003) 1927-1935
4. Backhaus S, Annen T, Epple M. A porous pH-stabilized composite material consisting of poly(D,L-lactide), calcium carbonate and gentamicin for bone substitution. *Materwiss Werksttech* 44 (2013) 107-111
5. Bakhsheshi-Rad HR, Ismail AF, Aziz M, Akbari M, Hadisi Z, Khoshnava SM, Pagan E, Chen X. Co-incorporation of graphene oxide/silver nanoparticle into poly-L-lactic acid fibrous: A route toward the development of cytocompatible and antibacterial coating layer on magnesium implants. *Mater Sci Eng C* 111 (2020) 110812
6. Banerjee SS, Tarafder S, Davies NM, Bandyopadhyay A, Bose S. Understanding the influence of MgO and SrO binary doping on the mechanical and biological properties of  $\beta$ -TCP ceramics. *Acta Biomater* 6 (2010) 4167-4174
7. Bartrop JA, Owen TC, Cory AH, Cory JG. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorg Med Chem Lett* 1 (1991) 611-614
8. Barrère F, Van Blitterswijk CA, De Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int J Nanomed* 1 (2006) 317-332
9. Berner A, Reichert JC, Woodruff MA, Saifzadeh S, Morris AJ, Epari DR, Nerlich M, Schuetz MA, Hutmacher DW. Autologous vs. allogenic mesenchymal progenitor cells for the reconstruction of critical sized segmental tibial bone defects in aged sheep. *Acta Biomater* 9 (2013) 7874-7884



10. Bölgen N, Yang Y, Korkusuz P, Güzel E, El Haj AJ, Pişkin E. Three-Dimensional Ingrowth of Bone Cells Within Biodegradable Cryogel Scaffolds in Bioreactors at Different Regimes. *Tissue Eng Part A* 14 (2008) 1743-1750
11. Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 21 (2000) 2347-2359
12. Butscher A, Bohner M, Hofmann S, Gauckler L, Muller R. Structural and material approaches to bone tissue engineering in powder-based three-dimensional printing. *Acta Biomater* 7 (2011) 907-920
13. Chen BQ, Kankala RK, Chen AZ, Yang DZ, Cheng XX, Jiang NN, Zhu K, Wang SB. Investigation of silk fibroin nanoparticle-decorated poly(l-lactic acid) composite scaffolds for osteoblast growth and differentiation. *Int J Nanomedicine* 12 (2017) 1877-1890
14. Cheng D, Cao X, Gao H, Wang Y. Engineering poly(lactic-co-glycolic acid)/calcium carbonate microspheres with controllable topography and their cell response. *J Mater Chem B* 1 (2013) 3322-3329
15. Daculsi G, Goyenvalle E, Cognet R, Aguado E, Suokas EO. Osteoconductive properties of poly(96l/4d-lactide)/beta-tricalcium phosphate in long term animal model. *Biomaterials* 32 (2011) 3166-3177
16. Delabarde C, Plummer CJ, Bourban PE, Manson JA. Biodegradable polylactide/hydroxyapatite nanocomposite foam scaffolds for bone tissue engineering applications. *J Mater Sci Mater Med* 23 (2012) 1371-1385
17. Diaz-Tocados JM, Herencia C, Martinez-Moreno JM, Montes de Oca A, Rodriguez-Ortiz ME, Vergara N, Blanco A, Steppan S, Almaden Y, Rodriguez M, Munoz-Castaneda JR. Magnesium chloride promotes osteogenesis through notch signaling activation and expansion of mesenchymal stem cells. *Sci Rep* 7 (2017) 7839
18. Dorozhkin SV. Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates. *Acta Biomater* 8 (2012) 963-677
19. Dorozhkin SV. Calcium orthophosphate bioceramics. *Ceram Int* 41 (2015) 13913-13966
20. Epple M. *Biomaterialien und Biomineralisation*. Springer Verlag. Berlin-Heidelberg-New York, 2003, 35-69
21. Eppley BL, Reilly M. Degradation characteristics of PLLA-PGA bone fixation devices. *J*

Craniofac Surg 8 (1997) 116-120

22. Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Pilet P, Daculsi G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* 19 (1998) 133-139
23. Gayer C, Ritter J, Bullemer M, Grom S, Jauer L, Meiners W, Pfister A, Reinauer F, Vučak M, Wissenbach K, Fischer H, Poprawe R, Schleifenbaum JH. Development of a solvent-free polylactide/calcium carbonate composite for selective laser sintering of bone tissue engineering scaffolds. *Mat Sci Eng C-Mater* 101 (2019) 660-673
24. Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, Hatton PV. An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int J Mol Sci* 15 (2014) 3640-3659
25. Gomez S, Vlad MD, Lopez J, Fernandez E. Design and properties of 3D scaffolds for bone tissue engineering, *Acta Biomater* 42 (2016) 341-350
26. Götz HE, Müller M, Emmel A, Holzwarth U, Erben RG, Stangl R. Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants. *Biomaterials* 25 (2004) 4057-4064
27. Habibovic P, De Groot K. Osteoinductive biomaterials - properties and relevance in bone repair. *J Tissue Eng Regen Med* 1 (2007) 25-32
28. Heidemann W, Jeschkeit S, Ruffieux K, Fischer JH, Wagner M, Krüger G, Wintermantel E, Gerlach KL. Degradation of poly(D,L)lactide implants with or without addition of calcium phosphates in vivo. *Biomaterials* 22 (2001) 2371-2381
29. Ho KN, Salamanca E, Chang KC, Shih TC, Chang YC, Huang HM, Teng NC, Lin CT, Feng SW, Chang WJ. A Novel HA/β-TCP-Collagen Composite Enhanced New Bone Formation for Dental Extraction Socket Preservation in Beagle Dogs. *Materials (Basel)* 9 (2016) 191
30. Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater* 4 (2005) 518-524
31. Indolfi L, Baker AB, Edelman ER. The role of scaffold microarchitecture in engineering endothelial cell immunomodulation. *Biomaterials* 33 (2012) 7019-7027
32. Johnson EO, Troupis T, Soucacos PN. Tissue-engineered vascularized bone grafts: basic science and clinical relevance to trauma and reconstructive microsurgery.

Microsurgery 31 (2011) 176-182

33. Kadiyala S, Jaiswal N, Bruder SP. Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defect. *Tissue Eng* 3 (1997) 173-185
34. Kaliva M, Georgopoulou A, Dragatogiannis DA, Charitidis CA, Chatzinikolaidou M, Vamvakaki M. Biodegradable Chitosan-graft-Poly(l-lactide) Copolymers For Bone Tissue Engineering. *Polymers (Basel)* 12 (2020) 316
35. Kamitakahara M, Ohtsuki C, Miyazaki T. Review paper: behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition. *J Biomater Appl* 23 (2008) 197-212
36. Kim YM, Lee JH. Clinical courses and degradation patterns of absorbable plates in facial bone fracture patients. *Arch Craniofac Surg* 20 (2019) 297-303
37. Krishnamurthy G, Murali MR, Hamdib M, Abbas AA, Raghavendran HB, et al. Characterization of bovine-derived porous hydroxyapatite scaffold and its potential to support osteogenic differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Ceram Int* 40 (2013) 771-777
38. Kondo A, Ogose A, Tokunaga K, Ito T, Arai K, Kudo N, Inoue H, Irie H, Endo N. Bone formation and resorption of highly purified beta-tricalcium phosphate in the rat femoral condyle. *Biomaterials* 26 (2005) 5600-5608
39. Lee JB, Park HN, Ko WK, Bae MS, Heo DN, Yang DH, Kwon IK. Poly(l-lactic acid)/hydroxyapatite nanocylinders as nanofibrous structure for bone tissue engineering scaffolds. *J Biomed Nanotechnol* 9 (2013) 424-429
40. Lee EJ, Kasper FK, Mikos AG. Biomaterials for Tissue Engineering. *Ann Biomed Eng* 42 (2014) 323-337
41. Lin J, German M, Wong B. Use of Copolymer Polylactic and Polyglycolic Acid Resorbable Plates in Repair of Orbital Floor Fractures. 30 (2014) 581-586
42. Linhart W, Meenen NM, Rueger JM. Knochenersatzmaterialien: neue Möglichkeiten und Techniken. *OP-Journal* 16 (2000) 294-298
43. Liu H, Peng H, Wu Y, Zhang C, Cai Y, Xu G, Li Q, Chen X, Ji J, Zhang Y, Ouyang HW. The promotion of bone regeneration by nanofibrous hydroxyapatite/chitosan scaffolds by effects on integrin-BMP/Smad signaling pathway in BMSCs. *Biomaterials* 34 (2013)

4404-4417

44. Locs J, Li W, Sokolova M, Roether JA, Loca D, Boccaccini AR. Zoledronic acid impregnated and poly (L-lactic acid) coated 45S5 Bioglass®-based scaffolds. *Mater Lett* 156 (2015) 180-182
45. Lopes D, Martins-Cruz C, Oliveira MB, Mano JF. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. *Biomaterials* 185 (2018) 240-275
46. McCullen SD, Zhu Y, Bernacki SH, Narayan RJ, Pourdeyhimi B, Gorga RE, Lobo EG. Electrospun composite poly(L-lactic acid)/tricalcium phosphate scaffolds induce proliferation and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biomed Mater* 4 (2009) 035002
47. Misch CE, Dietsch F. Bone-grafting materials in implant dentistry. *Impl Dent* 2 (1993) 158-167
48. Narayanan G, Vernekar VN, Kuyinu EL, Laurencin CT. Poly (lactic acid)-based biomaterials for orthopaedic regenerative engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 107 (2016) 247-76
49. Navarro M, Michiardi A, Castano O, Planell JA. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface* 5 (2008) 1137-1158
50. Perez RA, Won JE, Knowles JC, Kim HW. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 65 (2013) 471-496
51. Pietrzak WS, Eppley BL. Stability of craniofacial PLLA/PGA copolymer bioabsorbable screws. *J Craniofac Surg* 17 (2006) 331-336
52. Piskin E. Biodegradable polymeric matrices for bioartificial implants. *Int J Artif Organs* 25 (2002) 434-440
53. Schenk RK. Bone response to grafts and implants. *Perspectives on biomaterials. Materials Science Monographs* 33 (1986) 121-136
54. Schiller C, Epple M. Carbonated calcium phosphates are suitable pH-stabilising fillers for biodegradable polyesters. *Biomaterials* 24 (2003) 2037-2043
55. Seitz H, Rieder W, Irsen S, Leukers B, Tille C. Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 74

(2005) 782-788

56. Shalumon KT, Chennazhi KP, Tamura H, Kawahara K, Nair SV, Jayakumar R. Fabrication of three-dimensional nano, micro and micro/nano scaffolds of porous poly(lactic acid) by electrospinning and comparison of cell infiltration by Z-stacking/three-dimensional projection technique. *IET Nanobiotechnol* 6 (2012) 16-25
57. Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL, Coleman TR, Bottenfield S, Conley LJ, Kohlenberg SH, Castro KG, Dahan BA, Schable CA, Rayfield MA, Rogers MF. Transmission of human deficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. *N Engl J Med* 326 (1992) 726-732
58. Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J, Dias G. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review. *Biomaterials* 27 (2006) 1728-1734
59. Stevens MM. Biomaterials for bone tissue engineering. *Mater Today* 11 (2008) 18-25
60. Tavares Ddos S, Castro Lde O, Soares GD, Alves GG, Granjeiro JM. Synthesis and cytotoxicity evaluation of granular magnesium substituted  $\beta$ -tricalcium phosphate. *J Appl Oral Sci* 21 (2013) 37-42
61. Wagoner Johnson AJ, Herschler BA. A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair. *Acta Biomater* 7 (2011) 16-30
62. Walker J, Shadanbaz S, Woodfield TBF, Staiger MP, Dias GJ. Magnesium biomaterials for orthopedic application: a review from a biological perspective. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 102 (2014) 1316-1331
63. Wang XJ, Song GJ, Lou T. Fabrication and characterization of nano-composite scaffold of PLLA/silane modified hydroxyapatite. *Med Eng Phys* 32 (2010) 391-397
64. Wiedmann-Al-Ahmad M, Gutwald R, Gellrich NC, Hübner U, Schmelzeisen R. Search for ideal biomaterials to cultivate human osteoblast-like cells for reconstructive surgery. *J Mater Sci Mater Med* 16 (2005) 57-66
65. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 29 (2008) 2941-2953
66. Wolff KD, Hölzle F, Kolk A, Hohlweg-Majert B, Steiner T, Kesting MR. Raising the osteocutaneous fibular flap for oral reconstruction with reduced tissue alteration. *J Oral Maxillofac Surg* 69 (2011) e260-7

67. Wolff KD, Follmann M, Nast A. The diagnosis and treatment of oral cavity cancer. *Dtsch Arztebl internat* 109 (2012) 829-835
68. Woo KM, Seo J, Zhang R, Ma PX. Suppression of apoptosis by enhanced protein adsorption on polymer/hydroxyapatite composite scaffolds. *Biomaterials* 28 (2007) 2622-2630
69. Yaszemski MJ, Payne RG, Hayes WC, Langer R, Mikos AG. Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials* 17 (1996) 175-185
70. Yazdimamaghani M, Razavi M, Vashaei D, Moharamzadeh K, Boccaccini AR, Tayebi L. Porous magnesium-based scaffolds for tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 71 (2017) 1253-1266
71. Yoshizawa S, Brown A, Barchowsky A, Sfeir C. Magnesium ion stimulation of bone marrow stromal cells enhances osteogenic activity, simulating the effect of magnesium alloy degradation. *Acta Biomater* 10 (2014) 2834-2842
72. Zheng YF, Gu XN, Witte F. Biodegradable metals. *Mat Sci Eng R* 77 (2014) 1-34
73. Zhu ZJ, Shen H, Wang YP, Jiang Y, Zhang XL, Yuan GY. Effect of beta-tricalcium phosphate/poly-L-lactide composites on radial bone defects of rabbit. *Asian Pac J Trop Med* 6 (2013) 753-756

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Scaffoldaufbau. a: Dreidimensionale Ansicht, b: Draufsicht, c: Seitansicht, d: Querschnitt (Größen in mm). Maßstabsleiste = 1 mm.....8
- Abbildung 2: Scaffoldfertigung. a: Ausgangszustand, b: Reduktion der Wandung, c: Entfernung der Wandstärke, d: Vergrößerung und Drehung der Porengeometrie.....9
- Abbildung 3: Untersuchte Scaffolds in Kulturmedium. a: Poly-L-lactid acid-Calciumcarbonat (PLLA-CC), b: Poly-L-lactid acid-Tricalciumphosphat (PLLA-TCP), c: Poly-L-lactid acid-Polyglycolic acid-Calciumcarbonat (PLLA-PGA-CC), d: Poly-D,L-lactid acid-Magnesium (PDLLA-Mg), e: Poly-D,L-lactid acid (PDLLA), f:  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit ( $\beta$ -TCP-HA), g:  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP), h:  $\beta$ -Tricalciumphosphat' ( $\beta$ -TCP'). Maßstabsleiste = 10 mm.....10
- Abbildung 4: Umsetzung von Tetrazolium zu Formazan (modifiziert nach Technical Bulletin CellTiter 96 ® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA).....12
- Abbildung 5: Apoptose Assay. Durch Spaltung des Caspase-Substrats (a) durch Caspase-3/7 wird ein Luciferasesubstrat (b) freigesetzt. In Gegenwart von Luciferase und ATP resultiert die Produktion von Licht (modifiziert nach Technical Bulletin Caspase-Glo ® 3/7 Assay, Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA).....13
- Abbildung 6: Semiquantitative Auswertung der Oberflächenbesiedelung mittels Zählraster. Quadrate, die Poren enthalten, wurden nicht mitausgezählt.....16
- Abbildung 7: Eichkurve Proliferations Assay.....19
- Abbildung 8: Proliferations Assay der einzelnen Materialien. Bestimmung der Zahl proliferierender Zellen in den Scaffolds nach 2, 5, 7, 14 und 21 Tagen. \* : Statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ).....21

Abbildung 9: Proliferations Assay. Bestimmung der Zahl proliferierender Zellen in den Scaffolds nach 2, 5, 7, 14 und 21 Tagen (oben). Ausgleichsgeraden zur Bestimmung der Wachstumstendenz (unten).....	22
Abbildung 10: Apoptose Assay. Bestimmung der Apoptoseaktivität bezogen auf die Zellzahl im Scaffold nach 2, 5, 7, 14 und 21 Tagen (oben). Ausgleichsgeraden zur Bestimmung der Apoptosetendenz im Verlauf (unten). L: Lumineszenz.....	23
Abbildung 11: In-vitro Zytotoxizität bei 100 %igem unverdünnten Extrakt. Die humanen Osteoblasten die in Kontrolleextrakt (Negativkontrolle = gepunktete Linie, 100 %) oder in unverdünntem Extrakt der Scaffolds kultiviert wurden zeigen alle eine hohe Viabilität. * : Die Viabilität der in Dimethylsulfoxid (DMSO) (positive, zytotoxische Kontrolle) kultivierten Osteoblasten war im Vergleich zu den untersuchten Extrakten statistisch signifikant verringert ( $p < 0,05$ ).....	24
Abbildung 12: Extinktion bei 50 %igem und 100 %igem Extrakt. Die Extinktion ist direkt proportional zur Zahl stoffwechselnder Zellen und somit zur Viabilität. Die Werte der 50 %igen Extrakt-Verdünnungen war für alle Biomaterialien mindestens so hoch wie die der 100 %igen Extrakte, wie in der ISO-Richtlinie gefordert.....	25
Abbildung 13: Eichkurve Sulforhodamin B Assay.....	26
Abbildung 14: Sulforhodamin B Assay der einzelnen Materialien. Bestimmung der Zellzahl der im Milieu der Scaffolds wachsenden Osteoblasten nach 2, 5 und 7 Tagen. * : Statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ).....	27
Abbildung 15: Sulforhodamin B Assay. Bestimmung der Zellzahl der im Milieu der Scaffolds wachsenden Osteoblasten nach 2, 5 und 7 Tagen (oben). Ausgleichsgeraden zur Bestimmung der Wachstumstendenz (unten).....	28
Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopie der Scaffoldoberfläche mit Hoechst Staining Solution an Tag 21 nach Besiedlung. Die Oberflächenbesiedelung wurde mittels Zellauszählung beurteilt. Die gepunktete Linie entspricht dem Höchstwert von Poly-D,L-lactid acid (PDLLA) mit 391,7 Zellen/mm <sup>2</sup> . a: Poly-L-lactid acid-Calciumcarbonat (PLLA-CC), b: Poly-L-lactid acid-Tricalciumphosphat (PLLA-TCP), c: Poly-L-lactid acid-Polyglycolic acid-Calciumcarbonat (PLLA-PGA-)	



CC), d: Poly-D,L-lactid acid-Magnesium (PDLLA-Mg), e: PDLLA, f:  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit ( $\beta$ -TCP-HA), g:  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP), h:  $\beta$ -Tricalciumphosphat' ( $\beta$ -TCP'). Maßstabsleiste = 200  $\mu\text{m}$ .....29

Abbildung 17: Rasterelektronenmikroskopie Material Poly-L-lactid acid-Calciumcarbonat (PLLA-CC) Übersichtsaufnahme (30x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 500  $\mu\text{m}$ .....30

Abbildung 18: Rasterelektronenmikroskopie Material Poly-L-lactid acid-Calciumcarbonat (PLLA-CC) (500x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Pfeil = CC-Partikel. Maßstabsleiste = 50  $\mu\text{m}$ .....30

Abbildung 19: Rasterelektronenmikroskopie Material Poly-L-lactid acid-Tricalciumphosphat (PLLA-TCP) Übersichtsaufnahme (30x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 500  $\mu\text{m}$ .....31

Abbildung 20: Rasterelektronenmikroskopie Material Poly-L-lactid acid-Tricalciumphosphat (PLLA-TCP) (500x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 50  $\mu\text{m}$ .....31

Abbildung 21: Rasterelektronenmikroskopie Material Poly-L-lactid acid-Polyglycolic acid-Calciumcarbonat (PLLA-PGA-CC) Übersichtsaufnahme (30x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 500  $\mu\text{m}$ .....32

Abbildung 22: Rasterelektronenmikroskopie Material Poly-L-lactid acid-Polyglycolic acid-Calciumcarbonat (PLLA-PGA-CC) (500x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 50  $\mu\text{m}$ .....32

Abbildung 23: Rasterelektronenmikroskopie Material Poly-D,L-lactid acid-Magnesium (PDLLA-Mg) Übersichtsaufnahme (30x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Pfeil = Magnesiumhydroxydverbindungen. Maßstabsleiste = 500  $\mu\text{m}$ .....33

Abbildung 24: Rasterelektronenmikroskopie Material Poly-D,L-lactid acid-Magnesium (PDLLA-Mg) (500x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 50  $\mu\text{m}$ .....33

Abbildung 25: Rasterelektronenmikroskopie Material Poly-D,L-lactid acid (PDLLA) Übersichtsaufnahme (30x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 500 µm.....	34
Abbildung 26: Rasterelektronenmikroskopie Material Poly-D,L-lactid acid (PDLLA) (500x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 50 µm.....	34
Abbildung 27: Rasterelektronenmikroskopie Material $\beta$ -Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit ( $\beta$ -TCP-HA) Übersichtsaufnahme (30x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 500 µm.....	35
Abbildung 28: Rasterelektronenmikroskopie Material $\beta$ -Tricalciumphosphat-Hydroxylapatit ( $\beta$ -TCP-HA) (500x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 50 µm.....	35
Abbildung 29: Rasterelektronenmikroskopie Material $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP) Übersichtsaufnahme (30x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 500 µm.....	36
Abbildung 30: Rasterelektronenmikroskopie Material $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP) (500x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 50 µm.....	36
Abbildung 31: Rasterelektronenmikroskopie Material $\beta$ -Tricalciumphosphat' ( $\beta$ -TCP') Übersichtsaufnahme (30x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 500 µm.....	37
Abbildung 32: Rasterelektronenmikroskopie Material $\beta$ -Tricalciumphosphat' ( $\beta$ -TCP') (500x). Links besiedelt, rechts unbesiedelt. Maßstabsleiste = 50 µm.....	37

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	Vorbereitung der Puffer für die Rasterelektronenmikroskopie.....	17
Tabelle 2:	Fixierreihe Rasterelektronenmikroskopie.....	17

## Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta$ -TCP	$\beta$ -Tricalciumphosphat
$\beta$ -TCP'	$\beta$ -Tricalciumphosphat (mechanisch verbessert)
$\beta$ -TCP-HA	$\beta$ -Tricalciumphosphat -Hydroxylapatit
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
CC	Calciumcarbonat
$\text{cm}^2$	Quadratcentimeter
$\text{cm}^3$	Kubikcentimeter
$\text{CO}_2$	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DLP	Digital-Light-Processing
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Extinktion
ECM	Extrazelluläre Knochenmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FDM	Fused-Deposition-Modeling
h	Stunde
HA	Hydroxylapatit
HMDS	Hexamethyldisilazan
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	Destilliertes Wasser
L	Lumineszenz
Mg	Magnesium
min	Minute
ml	Milliliter
$\mu\text{l}$	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
$\text{mm}^2$	Quadratmillimeter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-tetrazolium
N	Newton

nm	Nanometer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDLLA	Poly-D,L-lactid acid
PDLLA-Mg	Poly-D,L-lactid acid – Magnesium
PEEK	Polyetheretherketon
PGA	Polyglycolic acid
pH	pH - Wert
PLLA	Poly-L-lactid acid
PLLA-CC	Poly-L-lactid acid – Calciumcarbonat
PLLA-PGA-CC	Poly-L-lactid acid - Polyglycolic acid - Calciumcarbonat
PLLA-TCP	Poly-L-lactid acid -Tricalciumphosphat
REM	Rasterelektronenmikroskop
Rpm	Umdrehungen pro Minute
SLS	Selective-Laser-Sintering

## **Publikation**

Geplante Veröffentlichung von Teilen der Doktorarbeit:

Pippich K, Hast K, Aksu A, Grom S, Wolfram T, Reinauer F, Fichter A, von Bomhard A. Biocompatibility of additively manufactured biomaterials for Bone Tissue Engineering Application. Eingereicht (Januar 2022): Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery.

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Dr. Achim von Bomhard für die großartige Betreuung und Hilfe bei dieser Arbeit sowie seine darüber hinaus gehende Unterstützung und immerwährende Inspiration für unser schönes Fach.

Auch Herrn PD Dr. Dr. Andreas Fichter danke ich sehr herzlich für die Korrektur und Betreuung dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Klaus-Dietrich Wolff für die Möglichkeit, an der Klinik und Poliklinik für Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie promovieren und Teil dieser Abteilung sein zu dürfen.

Frau Katharina Hast danke ich für die exzellente Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Jonas Eder und dem gesamten Team von Karl Leibinger Medizintechnik GmbH & Co. KG Herrn Adem Aksu, Frau Stefanie Grom, Herrn Dr. Tobias Wolfram und Herrn Frank Reinauer für die sehr inspirierende und motivierende Zusammenarbeit sowie die technische Umsetzung und fachliche Unterstützung bei diesem Projekt.

Herrn Dr. Philipp Paulitschke und seinem Team danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen.



Die Arbeit wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des Projekts "Aufbau von Industrie-in-Klinik-Plattformen zur Entwicklung innovativer Medizinprodukte" (Förderkennzeichen 13GW0248) gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.