

Diplomarbeit

**In-vitro Untersuchung der Zytotoxizität von
bioresorbierbaren Mg-Legierungen anhand der
Stoffwechselaktivität kultivierter MC3T3-Osteoblasten**

eingereicht von

Martin Raith

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Zahnmedizin
(Dr. med. dent.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

**Universitätsklinik für Zahnmedizin und Mundgesundheit
Klinische Abteilung für Orale Chirurgie und Kieferorthopädie**

unter der Anleitung von

**Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr.med. univ. Dr.med.dent.et scient.med.
Michael Payer**

Dr.med.dent. Valentin Herber

Graz, am 21.01.2024

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 21.01.2024

Martin Raith eh.

Danksagung

Ich möchte diesen Abschnitt nutzen, um mich bei allen, die mich bei der Niederschrift dieser Arbeit unterstützten, zu bedanken.

Zuallererst gilt mein Dank meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglichten und mich beständig unterstützen meinen persönlichen beruflichen Werdegang einzuschlagen. Auch meinem Bruder möchte ich danken für seinen technischen Rat während der Niederschrift dieser Arbeit.

Weiters gilt meinen beiden Betreuern Dr. Valentin Herber und Prof. Payer besonderer Dank für die Bereitstellung der Thematik, das konstruktive Feedback, die Organisation des Laborversuches sowie der Materialien und der immensen Geduld bis zur Fertigstellung dieser Diplomarbeit.

Auch dem Team der histologischen Abteilung des ZMF-Graz, besonders Frau Okutan Begüm, möchte ich hier für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und die labortechnische Unterstützung danken.

Abschließend will ich meinen großartigen Studienkollegen Konrad, Melanie, Lena, Sebastian sowie Thomas für sechs wundervolle gemeinsame Studienjahre danken und hoffe, trotz unterschiedlicher Lebenswege, auf ein baldiges Wiedersehen unter Kollegen.

Zusammenfassung

Traditionelle metallische Implantate konnten sich über Jahrzehnte als bewährte Mittel zur Frakturfixation beweisen. Heutzutage steigt allerdings die Nachfrage nach bioresorbierbaren Alternativen auf Magnesium-Basis um Kosten, postoperative Risiken und erneute Eingriffe zur Entfernung zu reduzieren beziehungsweise zu verhindern.

Zielsetzung:

Ziel dieser Arbeit ist es festzustellen, ob die modernen bioresorbierbaren Mg-Legierungen ZX00 und WE43 eine adäquate Biokompatibilität für den klinischen Alltag vorweisen und ob deren unterschiedlich rasches Degradierungsverhalten das umliegende Gewebe negativ beeinflusst.

Material und Methoden:

Es handelt sich um einen *in vitro* Versuchsaufbau bei dem die Mg-Legierungen ZX00 und WE43 reinem Titan (Grad 2) gegenübergestellt wurden. Als Zellbasis wurden MC3T3-E1 Zellen verwendet. Der Versuchsaufbau basiert auf einem CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay und es wurden pro Material vier Versuchsdurchgänge in jeweils 5 Verdünnungen durchgeführt. Abschließend wurde die Zellaktivität photometrisch vermessen und mittels Fluoreszenzmikroskop geprüft und fotografiert.

Ergebnisse:

Nach statistischer Auswertung zeigte sich, dass in purer Lösung eine klare Abnahme (ZX00: -88,39%; WE43: -88,32%) der Zellaktivität und somit der vitalen Zellen feststellbar ist. In Verdünnung hingegen zeigten beide untersuchten Mg-Legierungen allerdings positive Ergebnisse. Mit Ausnahme von WE43 in 1:2 Verdünnung (minimale Abnahme von -2,42%) konnte sogar ein genereller Anstieg der Zellaktivität und somit der vitalen Zellen festgestellt werden.

Schlussfolgerungen:

Diese Studie kommt zu dem Schluss, dass ZX00 und WE43 eine geeignete Biokompatibilität für die klinische Anwendung besitzen. Ausschließlich im

Verdünnungsverhältnis 300 µl Materiallösung zu 100 µl Zellmedium konnte eine signifikante Reduktion der vitalen Zellen festgestellt werden. Alle anderen betrachteten Verdünnungen zeigten hingegen mit TiGr2 vergleichbare positive Ergebnisse. Weitere Abklärung bedarf es vor allem im Rahmen von Co-Implantationen mit anderen Biomaterialien aufgrund der dabei entstehenden galvanischen Korrosion, sowie im Bereich der Materialherstellung bezüglich Oberflächenmodifikationen zur Reduktion der Resorptionsrate und somit der Verringerung der H₂-Gasakkumulation im periimplantären Gewebe.

Abstract

Traditional metallic implants are reliable tools for fracture fixation and treatment. However nowadays, the demand for biodegradable alternatives steadily rises and Mg-Based materials, which potentially could reduce costs, post-surgery risks and avoid a second operation, are intensively investigated.

Objective:

The aim of this study is to determine whether modern biodegradable materials such as ZX00 and WE43 show an appropriate biocompatibility for clinical use. Furthermore, it is to be determined whether the individual degradation-speed of these materials influences the surrounding tissue in a negative way.

Material and methods:

This study is based on an *in vitro* examination of the Mg-Alloys ZX00 and WE43 as well as pure titanium (Grade 2) for comparison. MC3T3-E1 cells were used as a basis. The trial was based on a CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay. Each material was examined in four cycles and in five dilutions per material every cycle. The results were recorded via photometric analysis, checked upon with a fluorescence microscope and lastly photographed.

Results:

After the statistical analysis, the data showed that the pure solutions caused a significant reduction (ZX00: -88,39%; WE43: -88,32%) in cell-activity and therefore vital cells. However, in dilution both examined Mg-Alloys showed positive results. Only the 1:2 dilution of WE43 caused a minor decrease (-2,42%) in cell-activity. All other investigated dilutions showed not only positive results but even increased cell-activity and therefor a higher number of vital cells.

Conclusions:

This study concludes, that ZX00 and WE43 show an appropriate biocompatibility. Only one of the investigated dilutions, 300 µl biomaterial-solution to 100 µl cell-medium, showed a significant decline in vital cells. All other solutions showed positive results similar to TiGr2. However, further research is necessary to

determine the significance of galvanic corrosion, which is occurring whilst co-implanted with other biomaterials. Also, additional studies regarding possible surface modifications to reduce the degradation-rate of Mg-Implants and therefore the rapid accumulation of H₂-gas, could prove beneficial.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und deren Erklärung.....	10
Abbildungsverzeichnis.....	12
Tabellenverzeichnis.....	13
Formelverzeichnis	13
1. Einleitung.....	14
1.1 Arten von Biomaterialien	15
1.1.1 Edelstahl	15
1.1.2 Co-Cr-Legierungen.....	16
1.1.3 Titan als Biomaterial.....	17
1.1.3.1 Funktionelle Eigenschaften von Titan und seinen Legierungen	18
1.1.3.2 Titan und seine Legierungen in der Zahnmedizin	20
1.1.4 Resorbierbare Mg-Legierungen	21
1.1.4.1 Magnesium-Legierung: ZX00.....	22
1.1.4.2 Magnesium-Legierung: WE43.....	22
1.1.4.3 Bioresorption von Mg-Legierungen	23
1.1.4.4 Einfluss der Legierungselemente.....	25
2. Hypothese und Ziel dieser Studie	27
3. Material und Methoden	28
3.1. Geräte und Materialien	28
3.2. Chemikalien und Lösungen	29
3.3. Versuchsaufbau.....	29
3.3.1. CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay	30
3.3.2. MC3T3-E1 Osteoblasten.....	31
3.4. Labortechnisches Procedere	31
3.4.1. Vorbereitung der Zellkultur	31
3.4.2. Vorbereitung der Biomaterialien.....	31
3.4.3. Verifizierung der vorbereiteten Zellkultur.....	32
3.4.4. Herstellung der Verdünnungen der Biomateriallösungen	33
3.4.5. Zell-Seeding	33
3.4.6. Kolorimetrische Analyse und Fluoreszenzmikroskopie	34
4. Ergebnisse.....	36
5. Diskussion	42
5.1. Genauigkeit und klinische Relevanz der Messergebnisse.....	42

5.2.	Bestehende in vitro Studien zu resorbierbaren Mg-Legierungen.....	43
5.3.	Bestehende in vivo und klinische Studien: ZX00	44
5.4.	Bestehende in vivo und klinische Studien: WE43.....	45
5.5.	Weitere Forschungswege	46
5.5.1.	Oberflächenmodifikationen von Mg-Legierungen.....	46
5.5.2.	Co-Implantation mit anderen Biomaterialien	47
6.	Konklusion	48
7.	Literaturverzeichnis.....	49

Abkürzungen und deren Erklärung

Ti	Titan
Co	Cobalt
Cr	Chrom
E-Modul	Elastizitätsmodul
Mg	Magnesium
H	Wasserstoff
H ₂	Hydrogen
Mo	Molybdän
C	Kohlenstoff
BCT	Body centered triagonal
BCC	Body centered cubic
FCC	Face centered cubic
GPa	Giga-Pascal
MPa	Mega-Pascal
Ni	Nickel
Mn	Mangan
CP-Ti	Commercially pure Titanium
YS	Yield Strength
UTS	Ultimate tensile Strength
Al	Aluminium
O	Sauerstoff
N	Stickstoff
B	Bor
Fe	Eisen
V	Vanadium
Cu	Kupfer
W	Wolfram
Nb	Niob
Ta	Tantal
CT	Computertomographie

MRT	Magnetresonanztomographie
Zr	Zirkon
Pd	Palladium
Cl	Chlor
Zn	Zinn
Ca	Kalzium
IMP	Intermetallische Partikel
Y	Yttrium
nm	Nanometer
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MW	Mittelwert
SD	Standarddifferenz
µmol/L	Mikromol pro Liter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur von MTS und dem verstoffwechselten Formazan Produkt (28).....	30
Abbildung 2: Zell-Seeding Protokoll	34
Abbildung 3: Verlauf der Mittelwerte der TiGr2 Verdünnungen	37
Abbildung 4: Verlauf der Mittelwerte der ZX00 Verdünnungen	38
Abbildung 5: Verlauf der Mittelwerte der WE43 Verdünnungen	38
Abbildung 6: Vergleich der Mittelwerte der Verdünnungen aller Materialien	39
Abbildung 7: Vergleich der Mittelwerte von TiGr2 und ZX00	40
Abbildung 8: Vergleich der Mittelwerte von TiGr2 und WE43	40
Abbildung 9: Vergleich der Mittelwerte von ZX00 und WE43	41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Edelstahl-Typen und ihre klinischen Anwendungsbereiche.....	16
Tabelle 2: Co-Cr-Mo-Legierungen und ihre Anwendungsbereiche.....	17
Tabelle 3: Ti-Legierungen und ihre mechanischen Eigenschaften.....	18
Tabelle 4: Material- und Umgebungseinflüsse auf die Resorption von Mg-Legierungen.....	23
Tabelle 5: Verwendete Materialien und Geräte sowie Hersteller.....	28
Tabelle 6: Verwendete Chemikalien und Lösungen sowie ihre Definitionen.....	29
Tabelle 7: Verdünnungsverhältnisse der untersuchten Konzentrationen.....	33
Tabelle 8: Grundlegender Datensatz; Mittelwerte und Standardabweichung.....	36
Tabelle 9: Relative Zu-/Abnahme der jeweiligen Verdünnungen in Vergleich zur NC.....	36

Formelverzeichnis

Formel 1: Entstehung des $Mg(OH)_2$ Films.....	24
Formel 2: Chemischer Prozess der Hydrogengas-Entwicklung.....	24
Formel 3 Chemische Wechselwirkung mit periimplantäre Chlorid-Ionen.....	25

1. Einleitung

Biokompatible Materialien sind ein fundamentaler Bestandteil orthopädischer Chirurgie, insbesondere zur Versorgung von Frakturgeschehen, sowie im Bereich der Pädiatrie und der dentalen Implantologie. Traditionell finden vor allem Ti (Titan), Ti-Legierung, Edelstahl, sowie Co-Cr-Legierungen (Cobalt-Chrom) als unresorbierbare, biokompatible Implantate Anwendung. Diese zeichnen sich generell durch eine hohe Korrosionsresistenz, Stabilität und geringe Frakturgefahr aus. Konträr dazu steht ihr hohes E-Modul (Elastizitätsmodul), welches über dem des humanen Knochens liegt, dadurch zu stress-shielding Effekten und infolgedessen zur Abnahme der lokalen Knochendichte führen kann. Ein weiterer Nachteil findet sich in der Notwendigkeit diese Materialien nach Heilung des Frakturgeschehens aufgrund möglicher Langzeitkomplikationen wie Inflammation, Akkumulation metallischer Korrosionsprodukte, Wachstumseinschränkungen oder Abwanderungen der Implantate, wieder in einem erneuten chirurgischen Eingriff aus dem Körper zu entfernen. Demnach wuchs der klinische Bedarf nach biokompatiblen, resorbierbaren Materialien.

Besonders Mg (Magnesium) und Mg-Legierungen konnten sich in naher Vergangenheit bewähren, da sie basierend auf ihrem dem Knochen ähnlichem E-Modul einen geringeren stress-shielding Effekt hervorrufen und aufgrund der laufenden Resorption kein Bedarf eines zweiten chirurgischen Eingriffes zur Prävention von Langzeitkomplikationen besteht.

Die rasche Bioresorption Mg-basierter Implantate kann allerdings zu struktureller Instabilität führen und weiters wird im Rahmen des Abbaus Hydrogengas (H_2) in das umliegende Gewebe freigesetzt. Dies führt zur Entstehung intrakorporaler Gasansammlungen sowie zu einer Erhöhung des pH-Wertes im umliegenden Gewebe.

Um diesen Prozess entgegenzuwirken, wurden Mg-Legierungen mit nicht-toxischen Elementen entwickelt, wodurch die Oberflächenstruktur sowie das rasche Resorptionsverhalten der Implantate modifiziert werden konnte (1-5).

1.1 Arten von Biomaterialien

Die klinisch angewandten Biomaterialien zur Herstellung verschiedener Implantattypen können in Metalle, Keramiken, Polymere und Verbundstoffe klassifiziert werden.

Aufgrund der hohen Zuverlässigkeit metallischer Biomaterialien haben sie sich zur Unterstützung der skelettalen Regeneration sowie als Dentalimplantate etabliert. Zur klinischen Anwendung in diesem Bereich kommen verschiedene Ti-, Co-Cr-Legierungen und Edelstahl. Auch resorbierbare Mg-Legierungen fallen in diese Materialklasse (6,7).

1.1.1 Edelstahl

Hierbei handelt es sich um eine Eisen-Legierung mit 11-30% Chrom und unspezifischem Nickel. Edelstähle werden in vier Hauptkategorien unterteilt:

- Martensitisch (BCT-Kristallstruktur): beinhalten 12-14% Cr, 0,2-1% Mo, 0.1-1% C (Kohlenstoff). Charakteristisch sind ihr hoher Härtegrad, Stärke und ihre Verarbeitbarkeit. Allerdings weisen sie eine geringere Korrosionsresistenz auf.
- Ferrit (BCC-Kristallstruktur): bestehen aus 10.5- 27% Cr und geringer Mengen Ni.
- Austenit (FCC-Kristallstruktur): setzen sich aus maximal 0.15% C, mindestens 16% Cr und einem Zusatz aus Ni oder Mn zusammen, um die austenitische Kristallstruktur bei allen Temperaturen zu gewährleisten. Ihr Vorteil liegt in ihrer geringeren Tendenz zur Crack-Bildung unter Belastung oder durch Korrosion.
- Duplex (FCC- plus BCC-Phase): formen sich aus 19-28% Cr, bis zu 5% Mo und einer geringen Menge Ni. Vorteil liegt in der erhöhten Robustheit, sowie der erhöhten Resistenz gegenüber lokaler Korrosion und damit einhergehender Mulden- oder Crack-Bildung.

Gemeinsame Vorteile der Edelstahl-Legierungen sind die vergleichbar niedrigen Kosten, gute Verarbeitbarkeit sowie ihre geringe Abnutzungsneigung. Der limitierende Faktor für die intrakorporale Anwendung liegt in der Tendenz zur

korrosiven Crack-Bildung und Abrasion der protektiven Chrom-Oxid Oberfläche, wodurch unerwünschte Wechselwirkungen im menschlichen Körper induziert werden. Weiters tendieren sie zur Biofilm-Bildung, bakterieller Adhäsion und regen keine Osteoblasten-Proliferation an. Außerdem besitzen sie ein deutlich höheres E-modul (200 GPa) als humaner Knochen (10-30 GPa), was einen stress-shielding Effekt zur Folge hat. Dennoch finden Edelstähle vor allem bei der Herstellung medizinischer Instrumente (ca. 85% aller chirurgischen Instrumente bestehen aus Edelstahl-Legierungen) und Arbeitsflächen im klinischen Alltag Anwendung (Tab. 1) (6,7,8).

Materialtyp	Anwendungsgebiet	Beispiele
Martensitisch	Zahnmedizinische und Chirurgische Instrumente	Knochensägen, zahnmedizinische Bohrer, Wurzelheber, Scaler, Zangen, Skalpelle
Ferrite	Limitiert für chirurgische Instrumente	Instrumentengriffe, Guide-Pins
Austenite	Vielzahl nicht-implantierbarer, medizinischer Geräte	Nadeln, Abdrucklöffel, Arbeitsoberflächen, etc.
Duplex	Findet zurzeit keine klinische Anwendung	

Tabelle 1: Edelstahl-Typen und ihre klinischen Anwendungsbereiche (6)

1.1.2 Co-Cr-Legierungen

Cobalt-Chrom-Legierungen finden seit langen in der zahnmedizinischen Praxis Anwendung. Eingesetzt werden sie in Gerüsten herausnehmbarer Prothesen sowie für kieferorthopädische Brackets, Drähte oder Bänder. Aufgrund ihrer geringen Abnutzungstendenz werden auch künstliche Hüftgelenke aus diesem Biomaterial gefertigt. Legierungen werden häufig mit anderen Metallen wie Mangan, Molybdän oder Nickel hergestellt. Allerdings weisen sie mit einem E-modul von 210-253 GPa eine deutlich höhere Steife als der humane Knochen (kortikaler Knochen 15-30 GPa) auf, wodurch im Falle einer Fraktur-Versorgung

ein höherer stress-shielding Effekt auftritt. Weiters können sie zu allergischen Reaktionen und im Bereich der Mundhöhle zu inflammatorischen Geschehen führen.

Klinische Anwendung finden meist Co-Cr-Mo-Legierungen. Sie bestehen aus 28% Cr, 6% Mo und Co zur Stabilisierung (Tab.2) (6,9,10,11).

Materialart	Vorteile	Nachteile	Anwendungsgebiete
Co-Cr-Mo	Abnützungsresistenz	Allergien, GPa deutlich höher als bei humanen Knochen	Knochen- und Gelenksprothesen, Dentalimplantate, prothetische Zahnversorgungen, Kieferorthopädie, Herzklappen

Tabelle 2: Co-Cr-Mo-Legierungen und ihre Anwendungsbereiche (6)

1.1.3 Titan als Biomaterial

Titan und seine Legierungen werden in verschiedensten Bereichen der medizinischen Praxis angewandt. Sie kommen zum Beispiel im Rahmen von Athroplasien, chirurgischen Instrumenten, extra- und intrakorporalen Prothesen aber auch in der zahnmedizinischen Implantologie zum Einsatz. Vorteil liegt in ihrer hohen Abnützungsresistenz, generellen guten Biokompatibilität, ihrem dem kortikalen Knochen - im Vergleich zu anderen metallischen Biomaterialien - ähnlichen E-Moduls, sowie in ihrem hohen Korrosionswiderstand. Trotz der Vorteile von CP-Ti (reines Titan) wurden für die klinische Anwendung eine Vielzahl von Legierungen untersucht (Tab. 3), um eine angemessene Versorgung in den verschiedenen Anwendungsbereichen zu gewährleisten (12).

Legierung	Mikrostruktur	E-Modul	YS (MPa)	UTS(MPa)
CP-Ti	α	105	692	785
Ti-6Al-4V	$\alpha + \beta$	110	850-900	960-970
Ti-6Al-7Nb	$\alpha + \beta$	105	921	1024
Ti-5Al-2.5Fe	Metastabil β	110	914	1033
Ti-15Mo-5Zr-3Al	Metastabil β	82	771	812
Ti-13Nb-13Zr	$\alpha' + \beta$	79	900	1030
Ti-35Nb-5Ta-7Zr	Metastabil β	55	530	590

Tabelle 3: Ti-Legierungen und ihre mechanischen Eigenschaften (13)

Titan ist ein Übergangsmetall (transition metal), das bei einer Temperatur von 882 °C (der β -Transus-Temperatur) in einer allotropischen Transformation von seiner α -Phase (hexagonal-dichte Kristallstruktur) zu einer β -Phase (kubische Kristallstruktur) übergeht. Diese benötigte Transus-Temperatur kann mittels α -stabilisierenden Elementen (Al, C, O, N, B) oder β -stabilisierenden Stoffen (Fe, Mo, V, Cr, Ni, Cu, W, Co, Nb, Ta) modifiziert werden. Daraus ergibt sich eine Klassifizierung der Titanlegierungen in α -, β -, metastabile- β - und $\alpha+\beta$ -Legierungen.

α -Legierungen zeigen bei Raumtemperatur eine geringe Zugfestigkeit, besitzen aber eine erhöhte Korrosionsresistenz.

β -Legierungen besitzen geringeren Widerstand gegenüber plastischer Deformation und eine höhere Duktilität (Fähigkeit sich unter Belastung permanent zu verformen).

$\alpha+\beta$ -Legierungen vereinen die gewünschte Korrosionsresistenz der α -Phase sowie die Formbarkeit und damit das geringere E-Modul der β -Phase. Vorzug bei der Implantat-Herstellung finden vor allem CP-Ti und die Titanlegierung Ti-6Al-4V (13).

1.1.3.1 Funktionelle Eigenschaften von Titan und seinen Legierungen

Titan wurde intensiv für den medizinischen Einsatz untersucht. Seine Eignung als biomedizinisches Material ergibt sich aus seinen funktionellen und chemischen Eigenschaften.

Die hohe Biokompatibilität ergibt sich durch die Bildung einer protektiven, oberflächlichen Oxid-Schicht, die sich bereits bei minimalen Mengen an Sauerstoff, wie es im menschlichen Körper der Fall ist, bildet. Diese Schicht verhindert biochemische Wechselwirkungen mit dem umgebenden Gewebe, ist unlöslich und chemisch höchst resistent.

Die Zugfestigkeit von Titan (die Kraft, die notwendig ist um ein Material unter Biegung zu brechen) liegt bei 760 MPa und übersteigt die von Edelstahl um 25%. Damit gilt sie als höchste unter den in Verwendung befindlichen metallischen Biomaterialien. Kortikaler Knochen weist im Vergleich eine Zugfestigkeit von 70-150 MPa auf.

Titan besitzt keine magnetischen Eigenschaften und weist eine geringe Dichte auf, wodurch mögliche Artefakte und Komplikationen im Rahmen von CTs (Computertomographien), MRTs (Magnetresonanztomographie) und Röntgenscans reduziert auftreten.

Das E-Modul von purem Titan liegt bei 110 GPa und befindet sich somit deutlich näher an jenem des Knochens (13-30) als Edelstahl (190 GPa) oder Co-Cr-Legierungen (210-253 GPa). Dadurch kommt es zu einem geringeren stress-shielding-Effekt und einer reduzierten Abnahme der lokalen Knochendichte.

Auch die Knochenintegration von Titan konnte nachgewiesen werden. Die sich oberflächlich bildende Oxidschicht agiert als Nichtleiter und hat dadurch keinen denaturierenden Effekt auf umliegendes Gewebe. Allerdings zeigten Studien, dass dieser Oxidoberflächenfilm keine Aufnahme von Kalziumphosphat in das umliegende Knochengewebe gewährleistet, was zu mangelnder Osseointegration und infolge zu Implantatverlusten führen kann (12).

Aufgrund dessen wurden verschiedene Oberflächenmodifikationen entwickelt, um den Implantationserfolg zu gewährleisten. Generell handelt es sich hierbei um biokompatible Beschichtungen zur Verbesserung der antimikrobiellen Eigenschaften, der mechanischen Stärke sowie der Biokompatibilität. Die am häufigsten vertretenen Oberflächenmodifikationen sind mechanischer Natur. Dazu zählen die Politur, Beschleiff, Sandstrahlen und die Laser-Radierung des Implantats. Diese Methoden dienen der besseren Bindung zwischen Implantat und seiner Beschichtung. Je nach gewünschten Eigenschaften kommen zur Beschichtung Materialien zum Einsatz, welche die mechanische Resistenz oder die Biokompatibilität stärken. Diamant-artiges Carbon (DLC) und Ti-Nitrat (TiN)

gelten als weit verbreitete Lösungen um Abnützungserscheinungen an der Implantatoberfläche zu reduzieren. Hydroxylapatit, Chitosan und TiN-Nanotube Strukturen, gelten hingegen als viable Methode um die Biokompatibilität von Ti-Oberflächen zu erhöhen (14).

1.1.3.2 Titan und seine Legierungen in der Zahnmedizin

Titan und seine Legierungen kommen im dentalen Bereich in erster Linie im Rahmen der prothetischen Zahnmedizin in Form von Dentalimplantaten zum Einsatz. Hierbei dienen sie als biokompatibler Zahnwurzelersatz. Nach Abschluss der Osseointegration ergibt sich eine stabile Verankerungsstruktur für die nach der Einheilungsphase zementierte oder verschraubte künstliche Zahnkrone. Ursprünglich wurde CP-Ti in seinen Reinheitsgraden I-IV für oralchirurgische Zwecke verwendet. Allerdings zeigte sich, aufgrund der anatomischen Gegebenheiten der Mundhöhle wie die Nähe zu anderen Zähnen und oftmals atrophierte Kieferkämme, ein Bedarf für ein Implantationsmaterial, welches auch bei einem geringeren Implantatdurchmesser eine adäquate mechanische Stabilität gewährleisten kann. Aufgrund dessen konnte sich die Titan-Legierung Ti-6Al-4V ($\alpha+\beta$ -Phase), auch Titan Grad V genannt, etablieren. Diese Legierung beinhaltet 6Al, 4V und ein Maximum von 0.25Fe sowie 0.2O in Gewichtsprozent. Ti-6Al-4V zeichnet sich durch eine höhere Stabilität, exzellenter Korrosionsresistenz und einem adäquatem E-Modul im Vergleich zu CP-Ti aus. Es wurden allerdings zytotoxische Reaktionen aufgrund von Aluminium- und Vanadium-Ionen klinisch festgestellt. Es wurden Vanadium-freie $\alpha+\beta$ -Legierungen wie Ti-6Al-7Nb und Ti-5Al-2.5Fe entwickelt, um den zytotoxischen Risikofaktor zu reduzieren. Weiters wurden auch Aluminium- und Vanadium-freie β -Legierungen erforscht, deren Komposition stattdessen nicht-toxische Elemente wie Nb, Ta, Zr und Pd enthält. Auch mechanisch bieten diese Legierungen einen Vorteil, da sie ein geringeres E-Modul (55-85 GPa) besitzen und somit dem des humanen Knochens näher sind. Auch in der Kieferorthopädie finden Titan-Legierungen Einsatz. Die verbreitetsten kieferorthopädischen Drähte bestehen aus Ti-Mo-Legierungen (β -Legierung) oder aus NiTi-Legierungen. Auch Ti-Nb-Kompositionen werden derzeit zur Feineinstellung am Ende der kieferorthopädischen Behandlung als Drahtmaterial

in Betracht gezogen. Weiters können kieferorthopädische Brackets aus Titan hergestellt werden. Ihr Vorteil im Vergleich zu Edelstahl-Brackets liegt in ihrer höheren Stabilität, Widerstandsfähigkeit, geringen Gewicht und reduzierten Tendenz zu allergischen inflammatorischen Reaktionen der Mundhöhle aufgrund ihrer favorablen Biokompatibilität (12,15,16,17,18).

1.1.4 Resorbierbare Mg-Legierungen

Resorbierbare Mg-Legierungen gelten als revolutionäre Alternative zu traditionellen orthopädischen Implantationsmaterialien. Magnesium zählt als essenzielles Element in einer Vielzahl natürlicher metabolischer Prozesse und ist im humanen Körper primär im Knochengewebe gespeichert. Über die tägliche Ernährung aufgenommenes Magnesium stimuliert das Wachstum von Osteoblasten und beschleunigt die Heilung von verletztem Knochengewebe. Resorbierbare Magnesium-Legierungen lösen sich in vivo durch die Anwesenheit von Cl^- Ionen, wodurch keine operative Entfernung indiziert ist. Dadurch werden erneute Kosten verhindert und das Risiko erneuter Symptomatik gilt als reduziert. Induziert durch die Resorption, verringert sich die mechanische Unterstützung durch bioresorbierbare Materialien. Dies führt zu einer früheren Übertragung der Kräfte auf den zuvor gestützten Knochen und verhindert dadurch Reduktionen der Knochendichte im geheilten Gebiet. Weiters weisen Mg-Legierungen erstrebenswerte mechanische Eigenschaften auf. Sie besitzen eine, vergleichsweise, geringe Dichte mit durchschnittlich $1,7\text{-}1,9\text{ g/cm}^3$ und ihr Elastizitätsmodul liegt mit circa 45 GPa relativ nahe an dem des humanen Knochens (2,5).

Trotz der vielversprechenden Eigenschaften von Mg-Legierungen für die klinische Anwendung stellte sich ihre geringe Korrosionsresistenz als Herausforderung dar. Aufgrund dessen wurden verschiedenste Strategien wie Purifikationen, Oberflächenmodifikationen sowie Legierungen mit nicht toxischen Elementen angewandt, um eine kontrollierte Korrosion, Resorption und bessere mechanische Eigenschaften zu gewährleisten (19,20).

1.1.4.1 Magnesium-Legierung: ZX00

Hierbei handelt es sich um eine Mg-Zn-Ca-Legierung, welche 0.45Zn und 0.45Ca in Gewichtsprozent enthält. Studien zeigten, dass Ca als Legierungselement das Korrosionsverhalten positiv beeinflusst. Weiters fördert Mg die Aufnahme von Ca in den humanen Knochen und kann dadurch zu einem begünstigten Heilungsprozess führen. Weiters wurde Zn als mögliches Legierungselement in Betracht gezogen, da es die Knochenformation fördert, die Knochendichte im betroffenen Gebiet erhält und eine geringere Apoptose im umgebenden Gewebe bewirkt. Ausgangspunkt für die Entwicklung von ZX00 war die Legierung ZX10 (Mg-1.0Zn-0.3Ca), diese weist eine hohe Zugfestigkeit von 40 MPa und ein adäquates Resorptionsverhalten auf. Diese mechanischen Eigenschaften bilden sich im Rahmen sequenzierter Hitzebehandlungen und der gezielten Präzipitation nanometrischer intermetallischer Partikel (IMPs), die während der Formung unter hohen Temperaturen für eine fein granuliert Mikrostruktur sorgen. Besonders die Zn-Komponente spielt hierbei eine bedeutende Rolle, da es als elektropositivstes Element dieser Legierung den Phasen-Typ der IMPs beeinflusst und dadurch Signifikanz für die Resorptionsgeschwindigkeit der entstehenden Legierung hat. Im Vergleich zu Legierungen mit höherem Zn-Gehalt wie ZX50 (5.0 Gewichtsprozent Zn) und ZX20 (1.5 Gewichtsprozent Zn) weist ZX10 eine signifikant niedrigere Resorptionsrate auf. Versuche den Zn-Anteil weiter zu senken, zeigten allerdings eine Reduktion der mechanischen Eigenschaften, da sie zu einer verringerten Bildung von IMPs und damit zu einer gröber-grulierten Mikrostruktur führten.

Um dies zu umgehen, wurde die Legierung ZX00 entwickelt. Hierbei wurde die Reduktion des Zn mittels Ca ausbalanciert, wodurch bei der Extrusion (Formgebung unter Druck) bei hoher Temperatur die Präzipitation der erforderlichen IMPs ermöglicht wird (20,21).

1.1.4.2 Magnesium-Legierung: WE43

Bei Magnesium-Legierungen des Typs WE handelt es sich um Kompositionen die Metalle der seltenen Erde (z.B. Yttrium, Cer, Praseodym) beinhalten. Dadurch

bilden sie in einer wasserartigen Umgebung einen protektiven Oxid-Film. Dies führt zu einer verbesserten Korrosionsresistenz und einer langsameren Resorption des Biomaterials. WE43 setzt sich aus 4.16Y, 0.36Zr, 0.2Zn, 0.13Mn (in Gewichtsprozent) und Mg zusammen. Anders als bei ZX00 führt die Präzipitation von IMPs zwar ebenfalls zu einer erhöhten Robustheit allerdings auch zu einer signifikanten Abnahme der Duktilität der Legierung. Aufgrund dessen wird die Legierung bei der Herstellung plastisch verformt (z.B. mittels Hochdruck-Torsionen oder multiaxialer Deformation). Dies führt zu einer Veränderung der Mikrostruktur zu einer ultrafein-granulierten Beschaffenheit. Studien zeigten, dass dieses Herstellungsverfahren die gewünschten mechanischen Eigenschaften gewährleistet ohne negativen Einfluss auf das Korrosionsverhalten auszuüben. WE43 weist eine Zugfestigkeit von 204 MPa auf und gilt damit mechanisch als adäquate Alternative zu traditionellen nicht-resorbierbaren Materialien (5,22,23).

1.1.4.3 Bioresorption von Mg-Legierungen

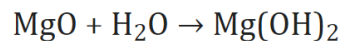
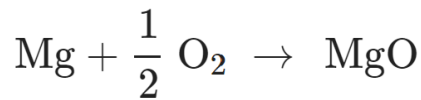
Grundlegend wird das Resorptionsverhalten von Mg-Implantaten durch die Legierungskomponenten und den direkten Umgebungsbedingungen des Implantats bestimmt (Tab. 4). Die Resorption beginnt in wässriger Umgebung als elektrochemischer Prozess unmittelbar nach Implantation (24).

Legierungseinflüsse	Umgebungseinflüsse
Implantattyp (Schrauben, Platten, etc.)	pH-Wert
Mikrostruktur	Vaskularisierung des periimplantären Gebietes
Legierungskomponenten (Material, Menge, Legierungsverfahren)	Cl ⁻ Level
Materialreinheit	Implantationsort
Herstellungsverfahren	

Tabelle 4: Material- und Umgebungseinflüsse auf die Resorption von Mg-Legierungen (24)

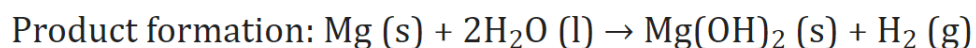
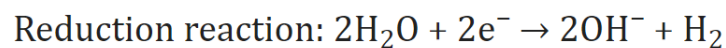
Magnesium oxidiert in wässrigen Lösungen aufgrund seines elektrochemischen Standardpotentials von -2.372 Volt. Ohne Wasserkontakt bildet es bei Raumtemperatur einen oberflächlichen MgO-Film, wodurch es in trockener Luft eine höhere Korrosionsresistenz als intrakorporal besitzt (Formel 1). Dieser 2.65

nm dicke Oxidfilm ist allerdings teils wasserlöslich und führt in wässriger Umgebung zur Ausfällung von $\text{Mg}(\text{OH})_2$ an den Oberflächen. Dies ist kaum in Wasser löslich und bewirkt eine basische Veränderung des pH-Werts der umliegenden Lösung (2).



Formel 1: Entstehung des $\text{Mg}(\text{OH})_2$ Films (2)

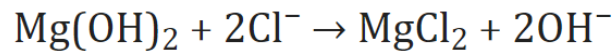
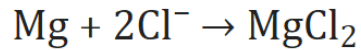
Die Degradation von Magnesium in wässriger Lösung beginnt mit einer anodischen Teilreaktion. Mg verliert 2 Elektronen und formt Mg^{2+} -Ionen. Das umliegende Wasser nimmt diese auf und es entstehen OH^- -Ionen sowie Wasserstoffgas (H_2). Dies führt zur Bildung von Gascavitäten im umliegenden Gewebe und einer Erhöhung des lokalen pH-Wertes. Je Mg-Atom bildet sich ein H_2 -Molekül (Formel 2) (2).



Formel 2: Chemischer Prozess der Hydrogengas-Entwicklung (2)

Im Anschluss an diese Reaktion formt sich ein in gewissem Grade protektiver $\text{Mg}(\text{OH})_2$ -Film auf der Implantatoberfläche. Die fortlaufende Entstehung von Wasserstoffgas verhindert allerdings die vollständige Ausfällung von $\text{Mg}(\text{OH})_2$, wodurch kein geschlossener Oberflächenfilm gebildet werden kann. Deswegen ist die Degradation von Mg nicht selbst-inhibierend, sondern setzt sich bis zur vollständigen Lösung des Materials fort.

Weiters wird der Abbauprozess durch Chlorid-Ionen im umgebenden Medium ($>30\text{mmol/L}$) beschleunigt, da der protektive $\text{Mg}(\text{OH})_2$ -Oberflächenfilm sich mit den Ionen bindet und das löslichere MgCl_2 bildet (Formel 3) (2,25).



Formel 3 Chemische Wechselwirkung mit periimplantäre Chlorid-Ionen (2)

1.1.4.4 Einfluss der Legierungselemente

Kalzium ist mit 2% des Körpergewichts eines Erwachsenen das fünft häufigste Element im menschlichen Körper. 0.1% des intrakorporalen Kalziums finden sich gelöst in extrazellulären Flüssigkeiten, während sich der Rest vor allem im skelettalen System, den Zähnen und Weichgeweben befindet. Ein Mangel wird über Knochenresorption und ein Überschuss via fäkale Exkretion reguliert. Der Einfluss von Ca als Legierungselement wird als dual beschrieben. Ca verfeinert die Mikrostruktur der Legierung und erhöht dadurch die Korrosionsresistenz. Jedoch bindet sich die primäre Mg₂Ca-Phase zusammen mit der Mg-Matrix über galvanische Korrosion, wodurch die Resistenz der Legierung reduziert wird. Studien konnten jedoch zeigen, dass durch Modifikationen dieser sekundären Phase sogar eine Reduktion der Resorptionsrate im Vergleich zu reinen Mg ermöglicht werden kann (26).

Zink gilt als essenzielles Spurenelement, welches in allen Geweben und Körperflüssigkeiten vorkommt. Es ist essenziell für Enzyme, die am Metabolismus von Kohlenhydraten, Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren beteiligt sind. Weiters spielt Zink eine zentrale Rolle in der Genexpression sowie bei der Stabilisierung von Zellstrukturen. Die Zn-Konzentration im Körper beträgt ca. 0.46 µmol/g der Magermasse des Körpers und wird homöostatisch reguliert. Zink als Legierungselement beeinflusst ebenfalls die Korrosionsresistenz sowie die Mikrostruktur positiv. Weiters reduziert Zn die Menge an Wasserstoffgas, die während der Resorption von Mg (Formel 2) entsteht und minimiert dadurch das Risiko potenziell entstehender Gascavitäten. Allerdings zeigen Legierungen mit erhöhtem Zn-Gehalt (>3 Gewichtsprozent) eine Tendenz zur mikrogalvanischen Korrosion aufgrund der Bildung größerer Mg-Zn-Intermetalle (25,26,27).

Mangan ist ebenfalls ein essenzielles Spurenelement. Es wird homöostatisch reguliert und ein Überschuss wird hauptsächlich über Stuhl und Galle ausgeschieden. Es sammelt sich hauptsächlich in der Leber, Pankreas, den Nieren und in kleinen Konzentrationen in Fett und Knochengewebe. Überschüsse können das zentrale Nervensystem beeinflussen und so kognitive und motorische Schwächen zur Folge haben. Ein längerer Mangel hingegen wird mit Parkinsons-Symptomen assoziiert. Als Legierungselement zeigte es die Fähigkeit einen protektiven MnO-Film zu bilden, der den korrosionsfördernden Einfluss von Chlorid-Ionen reduziert. Weiters minimiert es die Auswirkungen von Unreinheiten im grundlegenden Magnesium (25,26).

Zirkonium gilt als wirksames Element, um die Mikrostruktur der entstehenden Legierung zu verfeinern. Ein weiterer Vorteil liegt in der Dämpfungskapazität (ca. 80%) von Mg-Zr-Legierungen, wodurch Stress im Kontaktbereich zwischen Implantat und Gewebe reduziert wird. Studien zeigten, dass eine Addition von 1Zr (in Gewichtsprozent) Stärke sowie Duktilität verbessert und die Resorptionsrate um 50% senkt. Bei einem Anteil von über 1 Gewichtsprozent konnte allerdings nachgewiesen werden, dass Zr als Legierungselement auch zu einer Beschleunigung der Korrosionsrate führen kann. Zr zeigt sowohl in vitro als auch in vivo eine gute Biokompatibilität und Osseointegration (24,27).

Metalle der seltenen Erde wie Yttrium werden verwendet, um die finalen mechanischen Eigenschaften, die Resorptionsrate und die Biokompatibilität der Legierung zu optimieren. Meist werden sie mit anderen Legierungselementen kombiniert, da sie in der Regel zytotoxische Reaktionen hervorrufen. Dem entsprechend muss eine Balance zwischen Nutzen und Risiko angestrebt werden (24).

2. Hypothese und Ziel dieser Studie

Ziel dieser Arbeit ist es, die zytotoxischen Eigenschaften von den Mg-Legierungen WE43 und ZX00 anhand einer in vitro Zellkultur zu überprüfen und deren Eignung für die klinische Anwendung zu verifizieren.

Derzeit gilt Titan als Goldstandart, da es sich durch eine gute Biokompatibilität und eine hohe Korrosionsresistenz etablieren konnte. Bioresorbierbare Mg-Legierungen stellen aber aufgrund ihrer favorablen mechanischen Eigenschaften und der Tatsache, dass sie keinen zweiten Eingriff zur Entfernung des Implantatmaterials benötigen, eine zukunftssträchtige Alternative dar.

Allerdings bilden diese Legierungen abhängig von der Geschwindigkeit der Resorption Wasserstoffgas-Cavitäten im umliegenden Gewebe, die potenziell zytotoxisch auf das periimplantäre Gewebe wirken.

Im Rahmen dieser Studie wird die Zytotoxizität der beiden Legierungen anhand der Zellaktivität einer in vitro MC3T3-E1 Zellkultur geprüft und den Ergebnissen von CP-Ti (Grad2) gegenübergestellt.

Es besteht die Hypothese, dass keine entscheidende Reduktion der Zellaktivität zu verzeichnen sein wird, da die entstehenden Wasserstoffgase sich in zu geringen Mengen entwickeln, um maßgebliche Schäden im umliegenden Gewebe zu verursachen.

3. Material und Methoden

3.1. Geräte und Materialien

Tabelle 5: Verwendete Materialien und Geräte sowie Hersteller

Geräte	Hersteller
Glas Pasteurpipetten	Roth
Einkanal-Pipetten	Eppendorf
Sterile Pipettenspitzen	Eppendorf
Flakons 15 und 50 ml	Scabo Scandic
Serologische Pipetten	Becton Dickinson
Easypet	Eppendorf
Inkubator	RS Biotech
Vortex Mixer	IKA
Casy TT mit Casycups	Schärfe System
Sicherheitswerkbank	HERA Safe
96- Well Platten (weiß mit klarem Grund)	-
Spectrostar Omega (Kolorimeter)	BMG Labtech
Multifuge (Zentrifuge)	Kendro
Fluoreszenzmikroskop	-

Hersteller und Modelltypen entsprechen den in dieser Studie verwendeten Utensilien. Funktionell ähnliche Produkte können zur Reproduktion der Ergebnisse verwendet werden.

3.2. Chemikalien und Lösungen

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien und Lösungen sowie ihre Definitionen

Chemikalien und Lösungen	Definition
MC3T3-E1 Osteoblasten	Osteoprogenitor Zellen mit Ursprung in Mäuse-Calvarien
ZX00	Magnesium-Calcium-Zink Legierung
WE43	Magnesium-Legierung die aus 4.16Y, 0.36Zr, 0.2Zn, 0.13Mn (in Gewichtsprozent) enthält
TiGr2	Rein Titan Grad 2
MTS	Tetrazolium compound [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]
PMS	Phenazine methosulfat
PBS	Phosphat-gebufferte Salzlösung
α -MEM	Minimum Essential Medium mit alpha-Modifikation
TrypLE	Rekombinantes Enzym zur Dissoziation von Säugetierzellen
Tween	Membranlösendes Tensid
Ethanol	Aliphatischer, primärer Alkohol
HCl	Salzsäure
Casyton	Isotonischer Messbuffer für CasyTT-Messgeräte

3.3. Versuchsaufbau

Im Rahmen dieser in vitro Studie wurde, um die Biokompatibilität resorbierbarer Magnesiumlegierungen zu prüfen, ein CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay angewandt. Untersucht wurden dazu respektive die Magnesiumlegierungen ZX00, WE43 sowie nicht bioresorbierbares reines Titan (TiGr2). Als Zellbasis wurden MC3T3-E1 Osteoblasten verwendet, die von der klinischen Abteilung für Orthopädie und Traumatologie des LKH-Graz zur Verfügung gestellt wurden.

3.3.1. CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay

Ein CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay ist eine kolorimetrische Untersuchung zur Evaluierung der Stoffwechselaktivität und der Vitalität betrachteter Zellen. Die kolorimetrische Vermessung basiert auf der Bioreduktion der Tetrazolium Verbindung [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium) MTS und dem Elektronen-verbindenden Reagenz Phenazin-Methosulfat PMS. Viable (lebende) Zellen verstoffwechseln MTS zu einem in Zellkulturmedien löslichem Formazan Produkt. Die kolorimetrische Absorption des entstandenen Formazans kann anschließend bei einer Wellenlänge von 490 nm direkt vermessen werden. Die Konversion von MTS in das wasserlösliche Formazan wird induziert durch Dehydrogenase-Enzyme stoffwechselaktiver Zellen (Abb. 1). Die kolorimetrisch ermittelte Quantität des Formazan Produkts ist demnach direkt proportional zur Menge der vitalen Zellen (28).

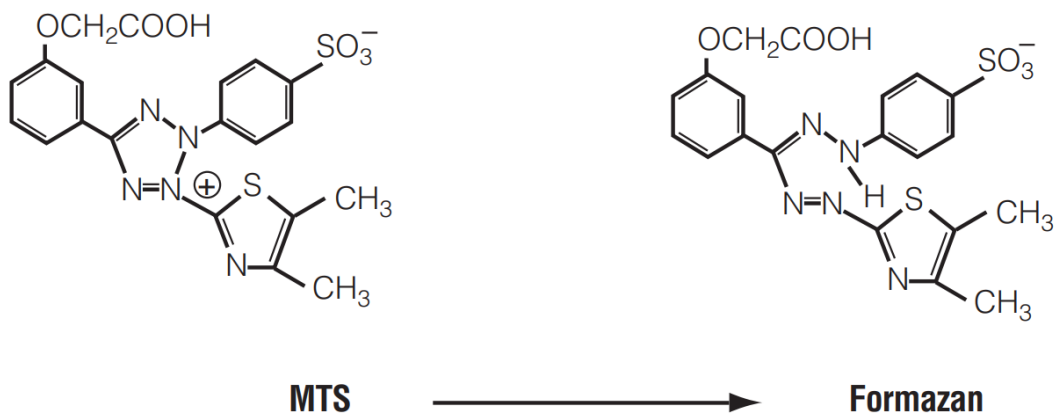


Abbildung 1: Chemische Struktur von MTS und dem verstoffwechselten Formazan Produkt (28)

3.3.2. MC3T3-E1 Osteoblasten

Es handelt sich um Osteoblasten-Progenitorzellen, gewonnen aus der Calvaria neu-geborener Mäuse. Diese Zellen konnten sich aufgrund ihres homogenen Charakters, ihrer einfachen Handhabung, der breiten Verfügbarkeit und ihrer ähnlichen Wachstumsrate im Vergleich zu humanen Osteoblasten für in vitro Untersuchungen, betreffend der Biokompatibilität betrachteter therapeutischer Wirkstoffe und Materialien, etablieren. MC3T3-E1 Osteoblasten gelten als bewährte Alternative zu primären humanen Osteoblasten im Rahmen von in vitro Untersuchungen (29,30).

3.4. *Labortechnisches Procedere*

3.4.1. Vorbereitung der Zellkultur

Die zur Verfügung gestellte MC3T3-E1 Kultur wurde bei Raumtemperatur (21°C) aufgetaut. Zur Reinigung der Zellen wurde die Zellkultur mit einer Sulfat-gepufferten Salzlösung (PBS) ausgewaschen. Anschließend wurde den Zellen 11 ml TrypLE beigemischt, um die bestehenden Oberflächenverbindungen der Zellen zu trennen und so Zellaggregationen zu unterbinden. Um diese Wirkung zu gewährleisten, wurde die Zellkultur im Anschluss für 10 Minuten bei 37°C in einen Inkubator platziert.

Im nächsten Schritt wurden 11 ml α -MEM (Zellmedium) hinzugefügt und die Zellkultur für 5 Minuten mit 3000 Umdrehungen pro Minute in einem Winkel von 23° zentrifugiert. Die daraufhin gereinigten Zellen wurden anschließend erneut mit 1 ml α -MEM versorgt und für 24 Stunden bei 37°C und 30 Kippmischungen pro Minute inkubiert.

3.4.2. Vorbereitung der Biomaterialien

Für diese Untersuchung wurden jeweils für die zu untersuchenden Biomaterialien WE43, ZX00 und TiGr2 zylindrische Proben mit einem Durchmesser von 3mm und einer Höhe von 1mm verwendet. Diese Proben wurden steril mit jeweils 560 μ l α -

MEM vermennt, wobei jeweils alle Proben vollständig von α -MEM bedeckt waren. Abschließend wurden die Proben für 48 Stunden bei 37°C und 30 Kippmischungen pro Minute inkubiert.

3.4.3. Verifizierung der vorbereiteten Zellkultur

Vor dem Start der Untersuchung wurde die aufbereitete Zellkultur mittels eines CASYton Zellzählers auf Zellviabilität und persistierende Zellaggregationen überprüft. Es wurden 50 μ l der Zellkultur entnommen und mit 200 μ l α -MEM vermischt (1:5 Verdünnung). Von dieser Verdünnung wurden abermals 50 μ l entnommen und mit 10 ml CASYton-Solution vermennt. Dieses Endprodukt wurde dem Zellzähler zur Analyse zugeführt.

Ergebnisse:

- Viable Zellen: 304100
- Relative Anzahl der viablen Zellen: 96.3%
- Aggregationsfaktor: 1,473 (im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Wert von 1,6 als Indikator für einen Versuchsabbruch festgelegt)

Da es sich hierbei um eine 1:5 Verdünnung handelt, lässt sich aus diesem Ergebnis errechnen, dass die gesamte Zellzahl der Kultur 1.520.500 beträgt.

$$303100 \times 5 = 1520500$$

Da der ermittelte Aggregationsfaktor im Rahmen der festgelegten Akzeptanzgrenze liegt, kann angenommen werden, dass sich die Zellen homogen im Zellmedium verteilt haben. Um vergleichbare Ergebnisse zwischen den untersuchten Biomaterialien zu erreichen, ist es notwendig in jedem der Wells eine identische Zellzahl zu platzieren. In Anbetracht der insgesamten Zellzahl wurde die untersuchte Zellzahl auf 20.000 pro Well festgelegt. Mittels des folgenden Rechenweges lässt sich ermitteln, dass 13,2 μ l der Zellkultur diese gewünschten 20.000 Zellen enthalten.

$$20000 \div 1520500 = 0,01315 \sim 0,0132 \text{ ml}$$

3.4.4. Herstellung der Verdünnungen der Biomateriallösungen

Nach Ablauf der 48-stündigen Inkubationsphase und der jeweils spezifischen Degradierung der Materialien (WE43, ZX00, TiGr2) in das umliegende Zellmedium wurden jeweils 5 Verdünnungen mit α -MEM hergestellt (Tab. 7), um die Auswirkungen der Abbauprodukte in verschiedenen Konzentrationen zu prüfen (Tab. 7).

Verdünnung	Menge der Biomateriallösung (μ l)	α -MEM (μ l)
Pur	300	100
1:2	150	100
1:5	60	100
1:10	30	100
1:20	15	100

Tabelle 7: Verdünnungsverhältnisse der untersuchten Konzentrationen

3.4.5. Zell-Seeding

Hierzu wurde eine Microplatte mit 96 Wells und klarem Grund verwendet. Nach Konzept (Abb.2), wurden 20.000 MC3T3-E1-Zellen (13,2 μ l) der vorbereiteten Zellkultur pro Well platziert und mit 100 μ l α -MEM vermengt. Je zu untersuchender Legierung (WE43, ZX00, TiGr2) wurden pro hergestellter Konzentration 3 Wells angelegt. 5 Wells wurden rein mit 100 μ l des verwendeten Zellmediums α -MEM gefüllt, um bei der kolorimetrischen Vermessung der Ergebnisse den Einfluss des Mediums zu beurteilen.

Zur Negativ-Kontrolle, der *in vitro* Untersuchung, wurden 3 Wells mit 13,2 μ l der reinen Zellkultur und 100 μ l α -MEM platziert, um anhand dieser vitalen Zellen ein fälschlicherweise negatives Ergebnis auszuschließen. Wäre hierbei ein erheblicher Verlust an vitalen Zellen kolorimetrisch feststellbar, müsste der Testdurchlauf als fehlerhaft angesehen werden.

Weiters wurden auch 2 Wells zur Positiv-Kontrolle angelegt. Dazu wurden 13,2 μ l der MC3T3-E1-Kultur mit 100 μ l α -MEM pro Well platziert. Anschließend wurde

diesen Wells jeweils 2 µl eines Zellmembran-lösenden Tensides (Tween) und Ethanol in einem Verhältnis von 1:1 beigemischt, um alle vorhandenen vitalen Zellen gezielt abzutöten. Könnte hier dennoch eine deutliche Stoffwechselaktivität der MC3TC-E1 Zellen kolorimetrisch nachgewiesen werden, ist der Versuchsdurchgang ebenfalls als fehlerhaft zu werten.

Nach Abschluss des Zell-Seedings wurde die Microplatte für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

B: Blank P: Positiv Kontrolle N: Negativ Kontrolle X: Biomateriallösungen in der entsprechenden Verdünnung

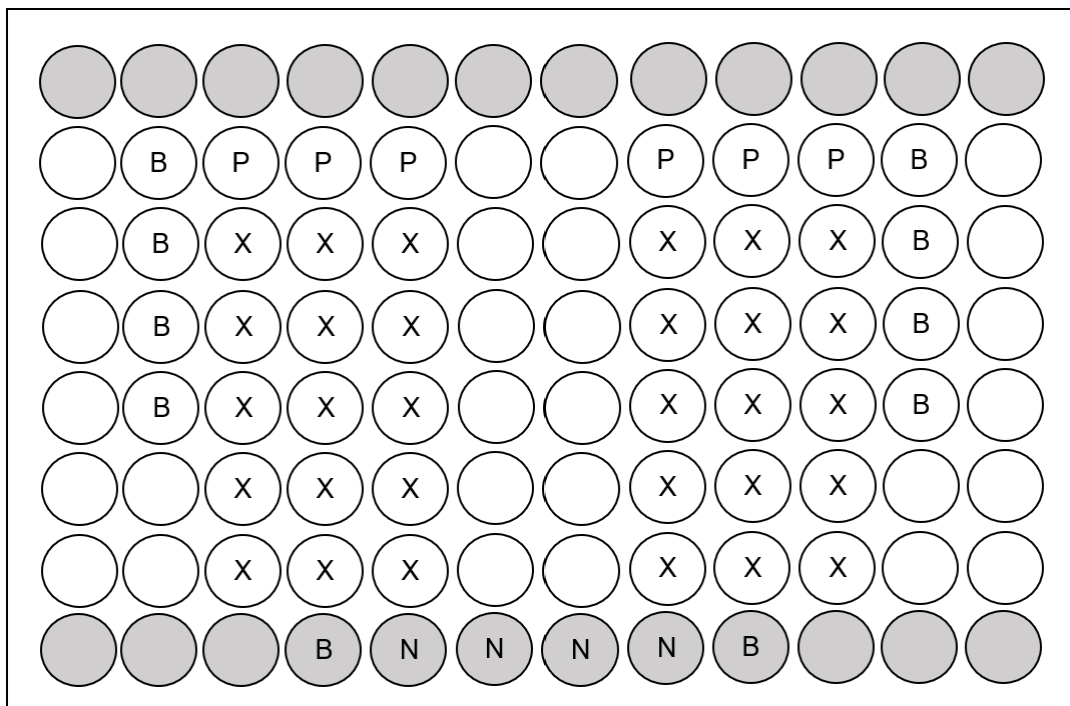


Abbildung 2: Zell-Seeding Protokoll

3.4.6. Kolorimetrische Analyse und Fluoreszenzmikroskopie

Nach Ablauf der 24-stündigen Inkubationsphase wurde sämtliches Zellmedium (α -MEM) aller Wells entfernt und erneut mit 100 µl α -MEM gefüllt. Sowohl die MTS- als auch die PMS- Lösung wurden aufgetaut. 100 µl der PMS-Lösung wurden unmittelbar vor der Addition in die Wells mit 2 ml MTS vermischt. In jeden Well wurden 20 µl der kombinierten PMS/MTS-Lösung pipettiert. Lebende Zellen

verstoffwechseln MTS zu einem Formazan Produkt, welches bei einer Wellenlänge von 490 nm kolorimetrisch vermessen werden kann und direkt proportional die Anzahl der vitalen Zellen widerspiegelt. Abschließend wurde die Microplatte erneut für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Folgend wurden die Wells mittels eines Kolorimeters vermessen.

Weiters wurden die Biomaterial-haltigen Wells mittels Fluoreszenzmikroskop in 10-facher und 20-facher Vergrößerung untersucht und digital fotografiert und zur Kontrolle den abgetöteten Zellen der Positiv-Kontrolle gegenübergestellt.

4. Ergebnisse

Alle drei untersuchten Biomaterialien TiGr2, WE43 und ZX00 wurden photometrisch vermessen. Hierbei ergaben sich pro Material und dessen fünf Verdünnungen nach 4 Versuchsdurchläufen 60-stellige Datensätze, die statistisch ausgewertet wurden. Da die photometrisch ermittelten Ergebnisse als direkt proportional zur Zellaktivität der untersuchten Wells gelten, kann dadurch Rückschluss auf die vorliegenden vitalen Zellen gezogen werden.

Verdünnung	Ti		WE43		ZX00	
	MW	SA	MW	SA	MW	SA
Pur	1,725	0,614	0,188	0,108	0,187	0,082
1:2	1,837	0,653	1,571	0,478	2,187	0,756
1:5	1,637	0,488	1,728	0,507	1,642	0,196
1:10	1,625	0,510	1,913	0,597	1,763	0,299
1:20	1,571	0,532	1,726	0,404	1,702	0,202

Tabelle 8: Grundlegender Datensatz; Mittelwerte und Standardabweichung

Aus diesen Datensätzen wurde der jeweilige Mittelwert pro Verdünnung und dessen Standardabweichung errechnet (Tab. 8). Diese Ergebnisse wurden als Grundlage für die weitere statistische und graphische Darstellung herangezogen.

Verdünnung	Ti (%)	WE43 (%)	ZX00 (%)
Pur	7,14	-88,32	-88,39
1:2	14,09	-2,42	35,84
1:5	1,67	7,32	1,99
1:10	0,93	18,82	9,50
1:20	-2,42	7,20	5,71

Tabelle 9: Relative Zu-/Abnahme der jeweiligen Verdünnungen in Vergleich zur NC

Zunächst wurde die relative Zunahme beziehungsweise Abnahme der Zellaktivität im Zusammenhang mit den untersuchten Biomaterialien geprüft. Hierzu wurde als Referenzwert der Mittelwert der Negativ-Control (Wells enthielten ausschließlich MC3TC-E1 Zellen und Zellmedium) aller vier Versuchsdurchläufe bestimmt. Dieser liegt bei 1,610 (gerundet auf 3 Nachkommastellen) (Tab.9).

TiGr2 zeigte eine generell positive Zellantwort. Die pure Lösung verzeichnet einen Zuwachs der Zellaktivität von 7,14%, die Verdünnung im Verhältnis 1:2 sogar eine Steigerung von 14,09%. Die weiteren Verdünnungen konnten ebenfalls mit einer positiven Entwicklung, 1:5 mit 1,67%, 1:10 mit 0,93% bestehen. Einzig die Verdünnung 1:20 wies eine Reduktion der Zellaktivität von -2,42% auf (Abb. 3).

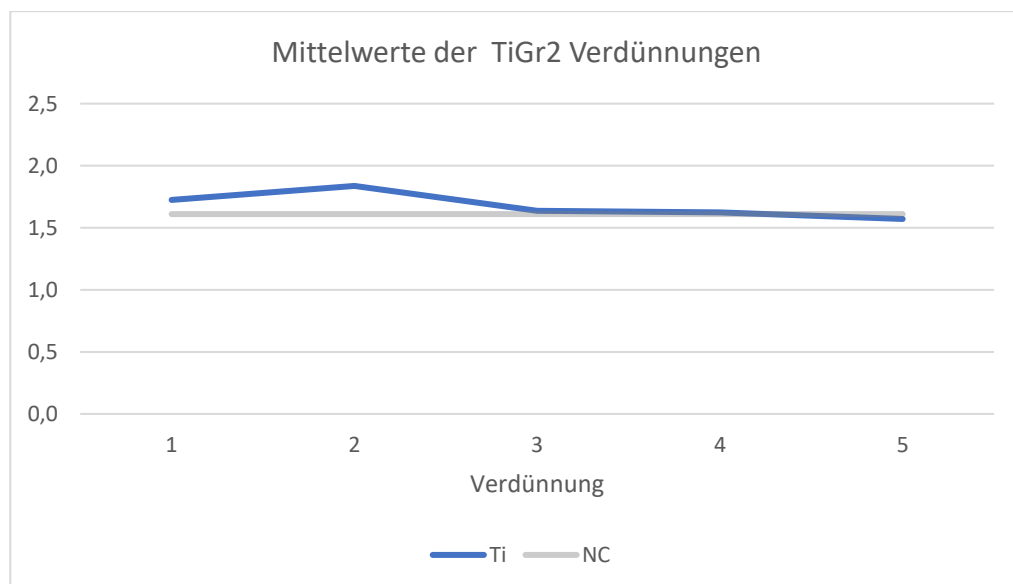


Abbildung 3: Verlauf der Mittelwerte der TiGr2 Verdünnungen

ZX00 konnte sich diesen positiven Ergebnissen anschließen. Einzig die pure Lösung zeigt mit -88,39% eine starke Reduktion der aufgezeichneten Zellaktivität. Die Verdünnung 1:2 zeigte jedoch bereits einen Zuwachs von 35,84%. Die Verdünnungen 1:5, 1:10 und 1:20 konnten mit respektiven Zunahmen von 1,99%, 9,50% und 5,71% ebenfalls als biokompatibel evaluiert werden (Abb. 4).

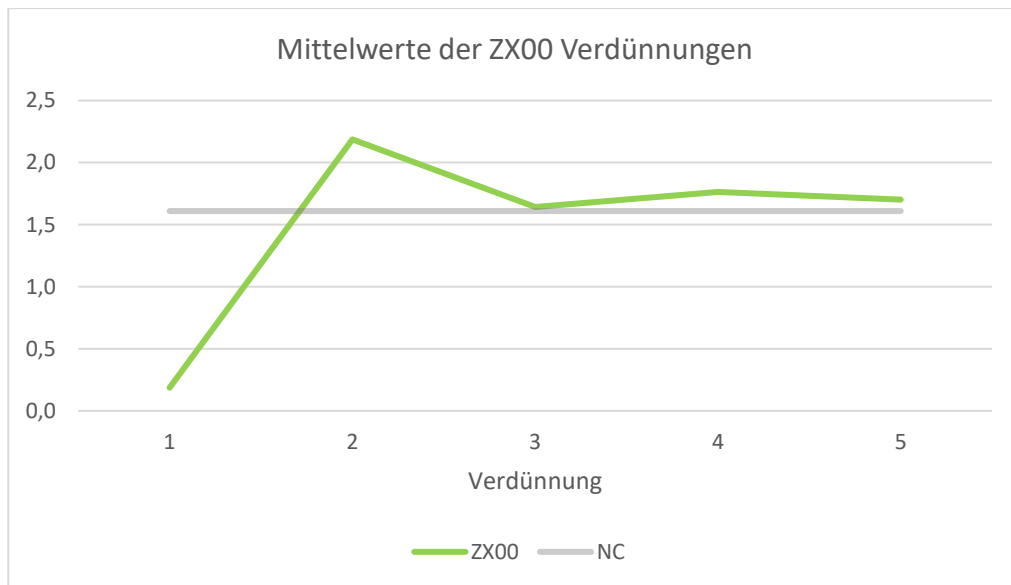


Abbildung 4: Verlauf der Mittelwerte der ZX00 Verdünnungen

WE43 zeigte in dieser Untersuchung die vergleichbar negativsten Ergebnisse. Die pure Verdünnung verzeichnet im Rahmen dieser Studie eine Abnahme von -88,32%. Auch die 1:2 Verdünnungen zeigte mit -2,42% eine Reduktion der Zellaktivität. Die Verdünnungen 1:5, 1:10 und 1:20 zeigten jedoch jeweils eine Zunahme von 7,32%, 18,82% und 7,20% (Abb. 5).

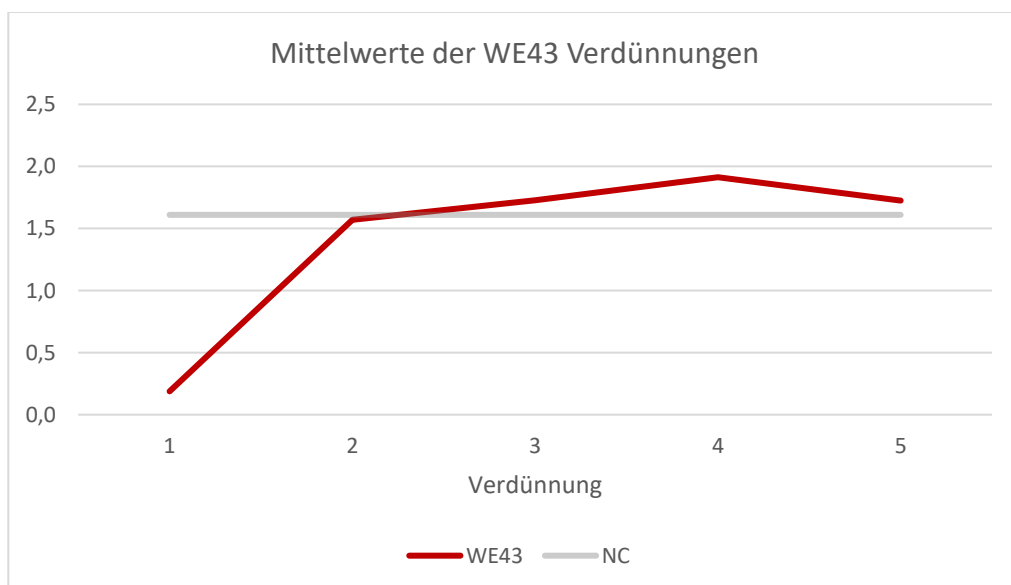


Abbildung 5: Verlauf der Mittelwerte der WE43 Verdünnungen

Wenn man diese Ergebnisse gegenüberstellt, lässt sich erkennen, dass die überprüften Mg-Legierungen ZX00 und WE43 ausschließlich in purer Konzentration signifikant negative Auswirkungen auf die untersuchten MC3TC-E1 Osteoblasten ausübten. In höherer Verdünnung zeigen sie hingegen eine vergleichbare, teils sogar favorable Biokompatibilität zu dem herkömmlichen Implantatmaterial TiGr2 (Abb. 6).

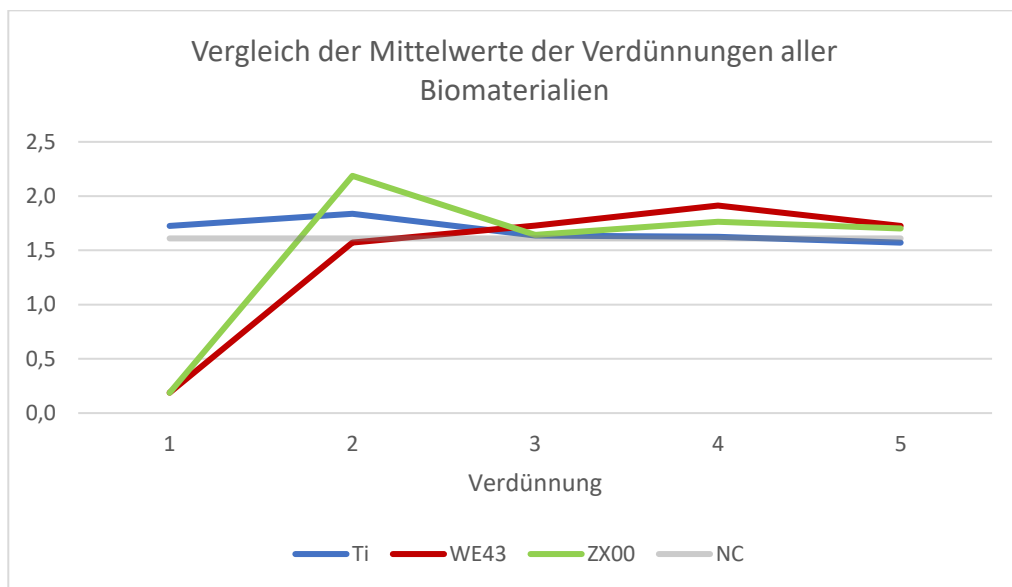


Abbildung 6: Vergleich der Mittelwerte der Verdünnungen aller Materialien

Im Vergleich zwischen TiGr2 und ZX00 zeigen sich folgende Unterschiede: Die Photometrie ergab für die jeweils pure Lösung respektive einen Wert von 1,725 (TiGr2) sowie 0,187 (ZX00). Dies entspricht einer Abnahme der aufgezeichneten Zellaktivität um -89,16%. Die 1:2 Verdünnungen zeigen allerdings bereits eine Zunahme um 19,05% zugunsten der Mg-Legierung. Auch die Verdünnungen 1:5, 1:10 und 1:20 können mit positiven Entwicklungen, 0,31%, 8,49% und 8,34%, bezogen auf die Werte des TiGr2, überzeugen (Abb. 7).

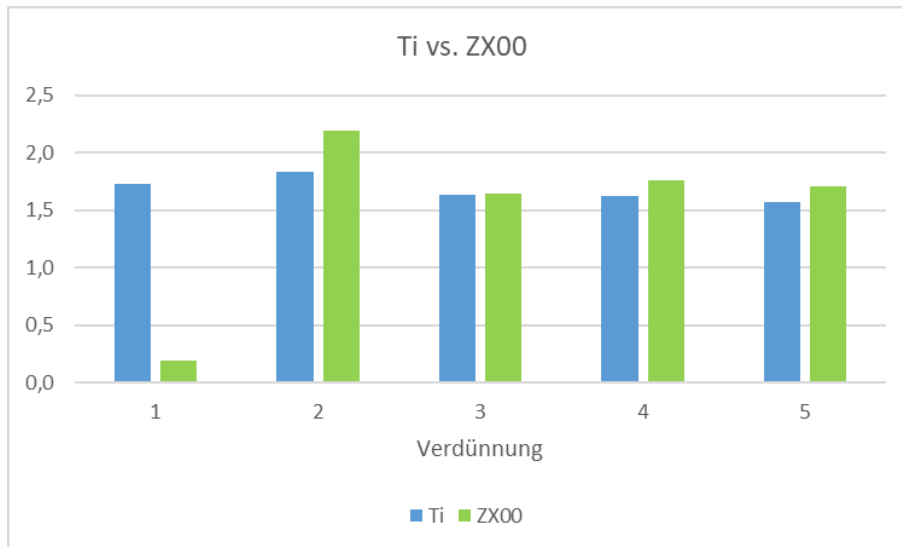


Abbildung 7: Vergleich der Mittelwerte von TiGr2 und ZX00

Auch WE43 zeigt im direkten Vergleich zu TiGr2 großenteils positive Ergebnisse. In purer Lösung zeigt sich abermals mit einem Wert von -89,10% eine starke Abnahme der Zellaktivität verglichen zu TiGr2. Allerdings bewies sich die 1:2 Verdünnung bereits mit einer geringeren Reduktion um -14,48%. Den weiteren Verdünnungen konnte im Rahmen dieser Untersuchung allen eine marginal bessere Biokompatibilität im Vergleich zu TiGr2 nachgewiesen werden. Bei der 1:5 Verdünnung ergibt sich ein Anstieg um 5,56%. Die beiden Verdünnungen 1:10 und 1:20 konnten jeweils einen relativen Anstieg um 17,77% sowie 9,87% verzeichnen (Abb. 8).

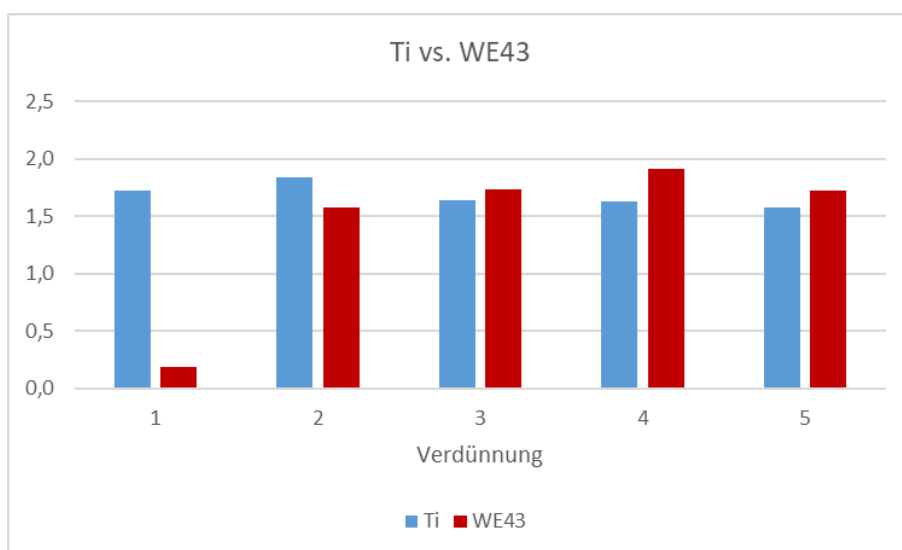


Abbildung 8: Vergleich der Mittelwerte von TiGr2 und WE43

Wenn man die beiden Mg-Legierungen vergleichend betrachtet, zeigen diese ähnliche Ergebnisse. In purer Lösung konnte die Legierung WE43 eine um 0,53% höhere Zellaktivität vorweisen. In 1:2 Verdünnung verzeichnete das Photometer eine um 39,21% höhere Zellaktivität zugunsten von ZX00. Bei den 1:5 Verdünnungen ergab sich im Vergleich ein Anstieg 5,24% für WE43. Dies zeigt sich auch bei den beiden weiteren Lösungen, 1:10 und 1:20, wo WE43 jeweils um 8,51% sowie 1,41% bessere Werte zeigen konnte (Abb. 9).

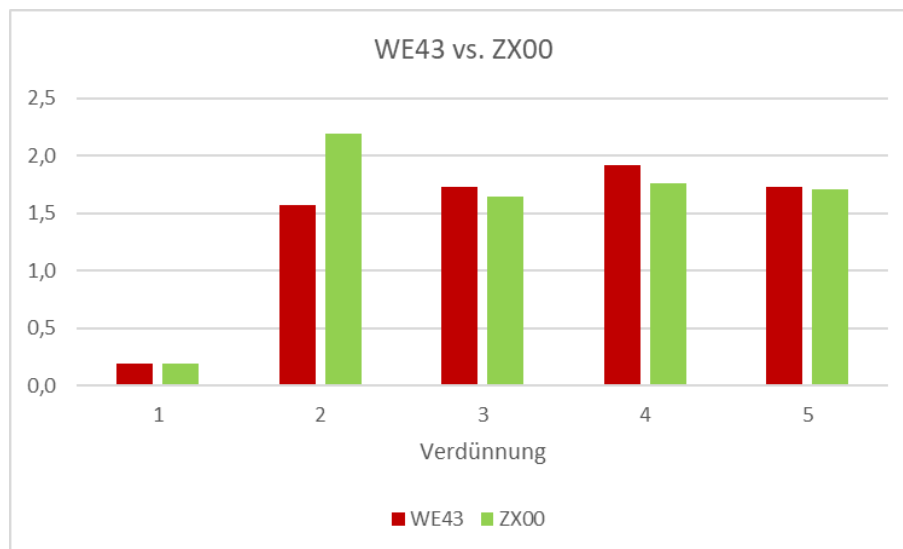


Abbildung 9: Vergleich der Mittelwerte von ZX00 und WE43

5. Diskussion

5.1. Genauigkeit und klinische Relevanz der Messergebnisse

Die Interpretation der ermittelten Ergebnisse beruht auf der photometrischen Absorption des entstandenen Formazan Produkts. Laut Hersteller des CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assays besteht hierbei eine direkte Proportionalität zur Anzahl der vitalen untersuchten Zellen. Dieser beschreibt einen Korrelationskoeffizient von 0,997 und somit eine 99,7% Übereinstimmung mit der tatsächlich vorhanden vitalen Zellzahl.

Um die statistische Sicherheit der Ergebnisse zu gewähren, wurden im Rahmen dieser Studie vier Versuchsdurchläufe pro Biomaterial und je Verdünnung durchgeführt. Die Ergebnisse wiesen mit Standartabweichungen von 0,082 bis 0,756 (Tab. 8) teils präzise Ergebnisse, teils aber auch eine signifikante Varianz, auf. Dies kann möglicherweise auf eine inhomogene Verteilung der Zellen im Medium und dadurch auf eine minimal unterschiedliche Zellzahl pro Well zurückzuführen sein. Ein weiter Einflussfaktor könnte sich in geringfügig abweichenden Inkubationszeiten der untersuchten Wells finden. Die angepeilten Zeitintervalle wurden zwar nach besten Möglichkeiten berücksichtigt, allerdings wurde diese Studie in einem geteilten Labor durchgeführt, wodurch es teilweise zu Verzögerungen aufgrund belegter Arbeitsplätze kam.

Da dies aber zu einem generellen Anstieg der ermittelten Zellvitalität in den betroffenen Durchgängen führte, kann dies für die Interpretation der Ergebnisse vernachlässigt werden, da der ausschlaggebende Faktor der relativen Zunahme bzw. Abnahme der vitalen Zellen im Vergleich zu Negativ-Control trotzdem akkurat ermittelt werden konnte.

Im Rahmen dieser Studie zeigten die beiden Mg-Legierungen ZX00 und WE43 nur in purer Verdünnung signifikante zytotoxische Auswirkungen. Hierbei handelt es sich um ein Mischungsverhältnis von 300 µl Biomaterial-Lösung mit 100 µl Zellmedium. Es ist anzunehmen, dass bei intrakorporaler Anwendung eine größere Menge an periimplantärem Medium vorliegt. Weiters befindet sich dieses im Körper in bestehender Bewegung, was zu einer geringeren Konzentration der Abbauprodukte führen sollte. Sämtliche weiteren untersuchten Verdünnungen

zeigten keine relevanten zytotoxischen Auswirkungen. Dadurch kommt diese Untersuchung zu dem Schluss, dass die bioresorbierbaren Mg-Legierungen ZX00 und WE43, besonders aufgrund ihrer favorablen mechanischen Eigenschaften, der Prävention einer zweiten Operation und ihrer Biokompatibilität eine zukunftssträngige Alternative im Rahmen von Frakturversorgungen darstellen.

5.2. *Bestehende in vitro Studien zu resorbierbaren Mg-Legierungen*

Kubásek J, et al (2015) untersuchten die Biokompatibilität von Mg-Zn-Legierungen (ZX-Typ) *in vitro* anhand von murinen Fibroblasten (L929) und humanen Osteosarkom-Zellen (U-2 OS). Zur Evaluierung der Zytotoxizität wurde ein WST-1 Assay angewandt. Dieses basiert ebenfalls auf der photometrischen Analyse eines Formazan-Produkts, das von vitalen Zellen aus einem Tetrazolium-Salz verstoffwechselt wird. Die Ergebnisse zeigten, dass in unverdünnter (184 µmol/L Zn, 1020 µmol/L Mg) und 75% Konzentration (138 µmol/L Zn, 765 µmol/L Mg) ein zytotoxischer Effekt feststellbar war. Bei einer Konzentration von 50% (92 µmol/L Zn, 510 µmol/L Mg) konnte allerdings bereits eine deutlich geringere Reduktion der vitalen Zellen (<20%) beobachtet werden. Die Studie schlussfolgert, dass Zn toxischer als Mg wirkt und beschreibt eine maximale Grenzkonzentration von 120 µmol/L Zn im Rahmen der U-2 OS-Zellen sowie eine Grenzkonzentration von 80 µmol/L für L929-Zellen. In Anbetracht dieser Ergebnisse urteilt diese Studie, dass Mg-Zn-Legierungen vielversprechendes Potential für die klinische Anwendung besitzen. (31)

Haibo Gong, et al. (2015) untersuchte ebenfalls die Zytotoxizität von Mg-Zn-Legierungen und WE43. Hierbei wurden ebenfalls L929-Zellen verwendet. Der Versuch beruht auf einem MTT-Assay, wobei wiederum das entstandene Formazan-Stoffwechselprodukt photometrisch vermessen wurde (nach 24h und 72h). Die Ergebnisse zeigten sowohl nach 24h als auch nach 72h keine signifikante Reduktion der Stoffwechselaktivität in den betrachteten Zellen. Die Studie kommt zu dem Schluss, dass die beiden Materialien eine adäquate Biokompatibilität für ihren Gebrauch als Implantatmaterial besitzen (32).

Liao Y, et al. (2015) nutzten ebenfalls ein MTT-Assay, um anhand von Hasenchondrozyten die Biokompatibilität von WE43 zu ergründen. Die Zellaktivität wurde nach einem, zwei und drei Tagen photometrisch vermessen. Die Ergebnisse zeigten eine initiale Reduktion der Zellzahl, die jedoch konstant bis zum fünften Tag anstieg. Die Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass WE43 eine zufriedenstellende Biokompatibilität im Rahmen der untersuchten Chondroblasten aufweist (33).

In einer weiteren Studie untersuchten Roh HJ, et al. (2022) Mg-Zn-Ca-Legierungen (0.1Ca und 0.3Ca) anhand von L929-Zellen. Hierzu wurde ein CCK-8 Assay angewandt. Auch hier wurde das entstandene Formazan-Produkt nach einem, drei und sieben Tagen photometrisch analysiert. Die Legierung mit 0.1Ca-Gehalt konnte sich mit positiven Resultaten an allen drei Messpunkten beweisen, während die Legierung mit 0.3Ca-Gehalt am 7 Tag eine Reduktion der vitalen Zellen aufwies. Diese Studie setze eine Reduktion von 20% als zytotoxische Grenze. Es wird angenommen, dass sich der Grund für diese Entwicklung in einer geringeren Korrosionsresistenz und somit in einer Akkumulation von Abbauprodukten, findet. Die Studie folgert, dass sich Mg-Zn-Ca-Legierung mit adäquater Modifikation für den klinischen Einsatz eignen (34).

5.3. *Bestehende in vivo und klinische Studien: ZX00*

Eine Studie von Patrick Holweg, et al. (2020) untersuchte die klinische Anwendung von ZX00 zur Frakturversorgung des medialen Malleolus anhand von 20 Patient/innen. Blutanalysen zeigten nach 12 Wochen keine erhöhten Ca oder Mg Spiegel und es konnte eine uneingeschränkte Knochenheilung nachgewiesen werden. Jedoch wird auch eine mögliche Relation zwischen der Größe des versorgten Knochens und dessen damit verbundene Fähigkeit das entstehende H₂-Gas zu verteilen und Implantatversagen (Lockerungen, Zystenbildungen) beschreiben (35).

R. Marek, et al. (2023) untersuchten die klinische Applikation von ZX00 im Rahmen elastisch-stabiler Intramedullärer Nägel (anhand von Schafen) zur Versorgung von Frakturen in der Pädiatrie. Es konnte keine negativen Auswirkungen auf das longitudinale Knochenwachstum und eine 95% Resorption

des Biomaterials nach 3 Jahren festgestellt werden. Die höchste H₂-Gasentwicklung konnte im Intervall 2-6 Wochen nach der Implantation festgestellt werden. Das größte Volumen konnte nach 24 Wochen aufgezeichnet werden, worauf eine stätige Reduktion bis zur 76. Woche folgte. Die Studie kommt zu dem Schluss, dass sich ZX00 als vielversprechendes Material für die klinische Anwendung beweisen konnte (36).

Romy Marek, et al. (2022) untersuchten den Einfluss verschiedener Knochenregionen auf die klinische Viabilität von ZX00-Implantaten. Dazu wurden ZX00- und vergleichend Ti-Schrauben in die distalen Metaphysen, sowie distalen Epiphysen von Schafs-Tibiae gesetzt. ZX00 zeigte eine adäquate Resorptionsrate und H₂-Gasentwicklung in beiden Arealen. Weiters bildete sich im Bereich der ZX00-Schrauben eine dickere Corticalis im Vergleich zu deren Titan Gegenstücken. Auch diese Studie schlussfolgert, dass sich ZX00 für die klinische Anwendung eignet (37).

5.4. Bestehende in vivo und klinische Studien: WE43

Soo-Hwan Byun, et al. (2020) überprüften die Biokompatibilität von WE43-Implantaten anhand eines Tierversuches mit zehn Hunden. Hierbei wurde die Versorgung im Rahmen von LeFort I Frakturen untersucht. Bei drei Hunden (5 in der experimentellen Gruppe) konnte man Schwellungen und eine erhöhte Gasformation feststellen. Weiters kam es bei zwei Hunden zu infraorbitalen Fistelbildungen und Entzündungserscheinungen, die sich nach 24 Wochen graduell zurückbildeten und schlussendlich vollständig sistierten. Nach 24 Wochen hatte sich das Biomaterial vollständig resorbiert und es konnte keine erneute Gasentwicklung festgestellt werden. Histologisch konnte keine Differenz zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden und der Knochen regenerierte sich vollständig. Die Studie schlussfolgerte, dass die mechanischen Eigenschaften von WE43 den klinischen Ansprüchen entsprechen und zieht WE43, mit adäquater Oberflächenmodifikation, für den klinischen Alltag in Betracht (38).

In einer weiteren Studie von Henning Windhagen, et al. (2013) wurden in einer randomisierten Studie 26 Patient/innen entweder mit WE43- oder Ti- Implantate derselben Art versorgt (Schrauben zur Versorgung nach Hallux-Operationen).

Beide Gruppen zeigten laut Studie nach 6 Monaten gute bis exzellente Ergebnisse. Bluttests zeigten keine Mg-Dysbalancen und es konnten keine palpierbaren Gasansammlungen festgestellt werden. Radiologisch konnte keine adverse Reaktion des Knochens auf das Biomaterial aufgezeichnet werden. Die Studie schlussfolgert, dass WE43 klinisch und radiologisch vergleichbare Kompetenz mit Ti-Implantaten aufweist (39).

Marcin Kozakiewicz, et al. (2022) erforschten ebenfalls die Biokompatibilität von WE43-Implantaten anhand von Frakturen des caput mandibulae. Zehn Patient/innen wurden mit WE43-Kompressionsschrauben und zehn Weitere, als Vergleichsgruppe, mit Ti-Implantaten (identer Aufbau) versorgt. Die Ergebnisse wurden nach 18 Monaten analysiert und beschrieben. Es konnten radiologisch keine Unterschiede in der Knochendichte der beiden Gruppen verzeichnet werden. Innerhalb der ersten drei Monate wird eine Gasakkumulation in der Testgruppe beschrieben, die sich allerdings in den folgenden 3 Monaten signifikant reduzierte (52 mm^3 zu 11 mm^3). Die Studie beschreibt allerdings keine negativen Auswirkungen dieser Gasentwicklung auf die Knochenheilung. Es wird geschlussfolgert, dass die WE43-Implantate in ihrer Biokompatibilität und der Knochenheilung Titan ebenbürtig sind und demnach aufgrund ihrer Fähigkeit zu resorbieren eine zukunftssträchtige Alternative für den klinischen Alltag darstellen (40).

5.5. Weitere Forschungswege

5.5.1. Oberflächenmodifikationen von Mg-Legierungen

Trotz der favorablen mechanischen Eigenschaften und adäquaten Biokompatibilität von Mg-Legierungen stellt die teils rasche Resorptionsrate und die damit verbundene rapide H_2 -Gasentwicklung sowie Abnahme der Stabilität eine bleibende Herausforderung dar. Diesen Faktoren wird bereits durch verschiedenen Modifikationen der Implantatoberfläche entgegengewirkt. Gängige Methoden sind derzeit die Anpassung der Legierungskomponenten, Oberflächenbehandlungen (Polituren, Beschichtungen, Beschleiff) oder plastische

Deformationen während der Herstellung zur Verfeinerung der Materialstruktur. Weitere potenzielle Möglichkeiten zur Reduktion der Resorptionsrate befinden sich derzeit noch in Entwicklung. Als vielversprechend wird dabei unter anderem Ultraschall-Wasser-Peening (die Oberfläche wird mittels Hochdruck-Wasserstrahl plastisch verformt) in Erwägung gezogen. Dies sollte positive Auswirkungen auf die Oberflächenintegrität und Korrosionsresistenz des Mg-Implantats gewährleisten. Auch Al-reiche Oberflächenbeschichtungen versprechen einen signifikanten Anstieg der Korrosionsresistenz. Hierbei sind allerdings weitere Untersuchungen zur Kontrolle der Biokompatibilität (Al besitzt zytotoxische Eigenschaften) unabdingbar und es ist fraglich, ob eine Balance aus Risiko und Nutzen gefunden werden kann (41,42).

5.5.2. Co-Implantation mit anderen Biomaterialien

Aufgrund ihres elektrochemischen Potentials findet bei Co-Implantationen verschiedener Biomaterialien eine galvanische Korrosion statt. Mg besitzt ein elektrochemisches Potential von -2.37 Volt und stellt somit das reaktivste Metall in der galvanischen Serie dar (Ti -1.63 Volt). Dadurch kommt es in einem elektrolytischen Raum zu einem Elektronen Fluss von dem anodischen Metall (Mg) zu dem kathodischen Material (z.B. Titan). Dies führt theoretisch bei Co-Implantation mit anderen Biomaterialien zu einer beschleunigten Resorption von Mg-Implantaten und somit zu einer erhöhten H₂-Gasentwicklung. Die Signifikanz dieser Reaktion scheint derzeit erst entschlüsselt zu werden und es besteht Bedarf an weiterer Forschung in diesem Bereich, um eine sichere klinische Anwendung in der Peripherie anderer Biomaterialien zu gewährleisten (43).

6. Konklusion

Diese Studie konnte zeigen, dass ZX00- und WE43-Implantate eine adäquate Biokompatibilität besitzen. Nur bei einem Verdünnungsverhältnis von 300 µl Biomateriallösung zu 100 µl Zellmedium konnte eine signifikante Reduktion der vitalen MC3TC-E1 Osteoblasten festgestellt werden. In sämtlichen anderen betrachteten Verdünnungen konnten sich die beiden Mg-Legierungen mit vergleichbaren Ergebnissen zu TiGr2 beweisen.

Dennoch besteht die Notwendigkeit weiterer Forschung, um die Resorptionsrate von Mg-Legierungen zu reduzieren und somit die H₂-Gasakkumulation im periimplantären Gewebe zu verringern. Hierbei gilt es besonders die Signifikanz der galvanischen Korrosion im Rahmen einer Co-Implantation zu prüfen, sowie das Potenzial neuer Oberflächenmodifikationen zur Reduktion der Resorptionsrate zu evaluieren.

7. Literaturverzeichnis

1. Lu Y, Deshmukh SC, Jones IP, Chiu YL. Biodegradable magnesium alloys for orthopaedic applications. PubMed [Internet]. 2021 Jan 1;2(3):214–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35836650>
2. Amukarimi S, Mozafari M. Biodegradable Magnesium Biomaterials—Road to the clinic. Bioengineering [Internet]. 2022 Mar 5;9(3):107. Available from: <https://doi.org/10.3390/bioengineering9030107>
3. Mantripragada VR, Lecka-Czernik B, Ebraheim NA, Jayasuriya AC. An overview of recent advances in designing orthopedic and craniofacial implants. Journal of Biomedical Materials Research Part A [Internet]. 2013 Jun 14;101(11):3349–64. Available from: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34605>
4. Amini AR, Wallace JS, Nukavarapu SP. Short-Term and Long-Term effects of orthopedic biodegradable implants. Journal of Long-term Effects of Medical Implants [Internet]. 2011 Jan 1;21(2):93–122. Available from: <https://doi.org/10.1615/jlongtermeffmedimplants.v21.i2.10>.
5. Liu C, Ren Z, Xu Y, Pang S, Zhao X, Zhao Y. Biodegradable magnesium alloys developed as bone repair materials: a review. Scanning [Internet]. 2018 Jan 1;2018:1–15. Available from: <https://doi.org/10.1155/2018/9216314>
6. Findik, Fehim. "Recent developments of metallic implants for biomedical applications." Periodicals of Engineering and Natural Sciences 8.1 (2020): 33-57.
7. Kirubaharan AMK, Chandrasekar AR, Dasan A, Pakseresht A, Galusek D. Recent advancements in materials and coatings for biomedical implants. Gels [Internet]. 2022 May 21;8(5):323. Available from: <https://doi.org/10.3390/gels8050323>
8. Resnik M, Benčina M, Levičnik E, Rawat N, Iglič A, Junkar I. Strategies for improving antimicrobial properties of stainless steel. Materials [Internet]. 2020 Jun 30;13(13):2944. Available from: <https://doi.org/10.3390/ma13132944>
9. Grosgeat B, Vaicelyte A, Gauthier R, Janssen C, Borgne ML. Toxicological risks of the Cobalt–Chromium alloys in dentistry: a systematic review. Materials [Internet]. 2022 Aug 23;15(17):5801. Available from: <https://doi.org/10.3390/ma15175801>

10. Patel B, Inam F, Reece MJ, Edirisinghe M, Bonfield W, Huang J, et al. A novel route for processing cobalt–chromium–molybdenum orthopaedic alloys. *Journal of the Royal Society Interface* [Internet]. 2010 Mar 3;7(52):1641–5. Available from: <https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0036>
11. Jabbari YSA. Physico-mechanical properties and prosthodontic applications of Co-Cr dental alloys: a review of the literature. *The Journal of Advanced Prosthodontics* [Internet]. 2014 Jan 1;6(2):138. Available from: <https://doi.org/10.4047/jap.2014.6.2.138>.
12. Sarraf M, Ghomi ER, Alipour S, Ramakrishna S, Sukiman NL. A state-of-the-art review of the fabrication and characteristics of titanium and its alloys for biomedical applications. *Bio-Design and Manufacturing* [Internet]. 2021 Oct 26;5(2):371–95. Available from: <https://doi.org/10.1007/s42242-021-00170-3>
13. Trevisan F, Calignano F, Aversa A, Marchese G, Lombardi M, Biamino S, et al. Additive manufacturing of titanium alloys in the biomedical field: processes, properties and applications. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials* [Internet]. 2017 Sep 25;16(2):57–67. Available from: <https://doi.org/10.5301/jabfm.5000371>.
14. Xu J, Zhang J, Shi Y, Tang J, Huang D, Yan M, et al. Surface modification of biomedical Ti and Ti alloys: A review on current advances. *Materials* [Internet]. 2022 Feb 25;15(5):1749. Available from: <https://doi.org/10.3390/ma15051749>
15. Haugen HJ, Chen H. Is There a Better Biomaterial for Dental Implants than Titanium?—A Review and Meta-Study Analysis. *Journal of Functional Biomaterials* [Internet]. 2022 Apr 20;13(2):46. Available from: <https://doi.org/10.3390/jfb13020046>
16. Osman RB, Swain MV. A Critical Review of Dental Implant Materials with an Emphasis on Titanium versus Zirconia. *Materials* [Internet]. 2015 Mar 5;8(3):932–58. Available from: <https://doi.org/10.3390/ma8030932>
17. Nakajima H, Okabe TH. Titanium in dentistry. *Dental Materials Journal* [Internet]. 1996 Jan 1;15(2):77-90,249. Available from: <https://doi.org/10.4012/dmj.15.77>
18. Jemat A, Ghazali MJ, Razali M, Otsuka Y. Surface modifications and their effects on titanium dental implants. *BioMed Research International* [Internet]. 2015 Jan 1;2015:1–11. Available from: <https://doi.org/10.1155/2015/791725>.
19. Martinez DC, Dobkowska A, Marek R, Ćwieka H, Jaroszewicz J, Płociński T, et al. In vitro and in vivo degradation behavior of Mg-0.45Zn-0.45Ca

- (ZX00) screws for orthopedic applications. *Bioactive Materials* [Internet]. 2023 Oct 1;28:132–54. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.05.004>.
20. Holweg P, Berger L, Cihova M, Donohue N, Clement B, Schwarze UY, et al. A lean magnesium–zinc–calcium alloy ZX00 used for bone fracture stabilization in a large growing-animal model. *Acta Biomaterialia* [Internet]. 2020 Sep 1;113:646–59. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.06.013>.
21. Okutan B, Schwarze UY, Berger L, Martinez DC, Herber V, Suljevic O, et al. The combined effect of zinc and calcium on the biodegradation of ultrahigh-purity magnesium implants. *Biomaterials Advances* [Internet]. 2023 Mar 1;146:213287. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213287>.
22. Добаткин СВ, Martynenko N, Anisimova N, Kiselevskiy M, Prosvirnin DV, Terentiev V, et al. Mechanical properties, biodegradation, and biocompatibility of ultrafine grained Magnesium alloy WE43. *Materials* [Internet]. 2019 Nov 4;12(21):3627. Available from: <https://doi.org/10.3390/ma12213627>
23. Antoniac I, Miculescu M, Paltanea VM, Stere A, Quan PH, Păltânea G, et al. Magnesium-Based alloys used in orthopedic surgery. *Materials* [Internet]. 2022 Feb 2;15(3):1148. Available from: <https://doi.org/10.3390/ma15031148>.
24. Pogorielov M, Husak Y, Solodivnik A, Zhdanov SM. Magnesium-based biodegradable alloys: Degradation, application, and alloying elements. *Interventional Medicine and Applied Science* [Internet]. 2017 Mar 1;9(1):27–38. Available from: <https://doi.org/10.1556/1646.9.2017.1.04>.
25. Persaud-Sharma D, McGoron AJ. Biodegradable Magnesium alloys: A review of material development and applications. *Journal of Biomimetics, Biomaterials, and Tissue Engineering* [Internet]. 2012 Feb 1;12:25–39. Available from: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/jbbte.12.25>
26. Hassan SF, Islam MdT, Saheb N, Baig MMA. Magnesium for Implants: A review on the effect of alloying elements on biocompatibility and properties. *Materials* [Internet]. 2022 Aug 18;15(16):5669. Available from: <https://doi.org/10.3390/ma15165669>
27. Huan Z, Leeflang MA, Zhou J, Fratila-Apachitei LE, Duszczyk J. In vitro degradation behavior and cytocompatibility of Mg–Zn–Zr alloys. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [Internet]. 2010 Jun 9;21(9):2623–35. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4111-8>

28. Promega, CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Technical Bulletin, Available from: https://at.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-non-radioactive-cell-proliferation-assay-protocol.pdf?rev=79ce8527cc9e43f9bce1af13bcb7bb31&sc_lang=en (Stand 17.08.2023)
29. Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards R, Hayes JS. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. In Search of an Osteoblast Cell Model for in Vitro Research. *Eur Cell Mater* [Internet]. 2012 Jul 9;24:1–11. Available from: <https://doi.org/10.22203/ecm.v024a01>.
30. Sudo H, Kodama H, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *Journal of Cell Biology* [Internet]. 1983 Jan 1;96(1):191–8. Available from: <https://doi.org/10.1083/jcb.96.1.191>.
31. Kubásek J, Vojtěch D, Jablonská E, Pospíšilová I, Lipov J, Ruml T. Structure, mechanical characteristics and in vitro degradation, cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of novel biodegradable Zn–Mg alloys. *Materials Science and Engineering: C* [Internet]. 2016 Jan 1;58:24–35. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.015>
32. Gong, H, Wang, K, Strich, R, Zhou, JG. 2015. In vitro biodegradation behavior, mechanical properties, and cytotoxicity of biodegradable Zn–Mg alloy. *J Biomed Mater Res Part B* 2015; 103B: 1632–1640.
33. Liao Y, Xu Q, Zhang J, Niu J, Yuan G, Jiang Y, et al. Cellular response of chondrocytes to magnesium alloys for orthopedic applications. *International Journal of Molecular Medicine* [Internet]. 2015 May 14;36(1):73–82. Available from: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2211>
34. Roh HJ, Park J, Lee S, Kim DH, Lee GC, Jeon H, et al. Optimization of the clinically approved Mg-Zn alloy system through the addition of Ca. *Biomaterials Research* [Internet]. 2022 Sep 5;26(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s40824-022-00283-5>
35. Holweg P, Herber V, Ornig M, Hohenberger G, Donohue N, Puchwein P, et al. A lean bioabsorbable magnesium-zinc-calcium alloy ZX00 used for operative treatment of medial malleolus fractures. *Bone and Joint Research* [Internet]. 2020 Aug 19;9(8):477–483. Available from: <https://doi.org/10.1302/2046-3758.98.bjr-2020-0017.r2>.
36. Marek R, Eichler J, Schwarze UY, Fischerauer S, Suljevic O, Berger L, et al. Long-term in vivo degradation of Mg–Zn–Ca elastic stable intramedullary nails and their influence on the physis of juvenile sheep. *Biomaterials*

- Advances [Internet]. 2023 Jul 1;150:213417. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213417>.
37. Marek R, Ćwieka H, Donohue N, Holweg P, Moosmann J, Beckmann F, et al. Degradation behavior and osseointegration of Mg–Zn–Ca screws in different bone regions of growing sheep: a pilot study. *Regenerative Biomaterials* [Internet]. 2022 Oct 18;10. Available from: <https://doi.org/10.1093/rb/rbac077>.
 38. Byun SH, Lim HK, Cheon KH, Lee SM, Kim H, Lee JH. Biodegradable magnesium alloy (WE43) in bone-fixation plate and screw. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [Internet]. 2020 Feb 12;108(6):2505–2512. Available from: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34582>.
 39. Windhagen H, Radtke K, Weizbauer A, Diekmann J, Noll Y, Kreimeyer U, et al. Biodegradable magnesium-based screw clinically equivalent to titanium screw in hallux valgus surgery: short term results of the first prospective, randomized, controlled clinical pilot study. *Biomedical Engineering Online* [Internet]. 2013 Jul 3;12(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/1475-925x-12-62>.
 40. Kozakiewicz M, Gabryelczak I, Bielecki-Kowalski B. Clinical evaluation of magnesium alloy osteosynthesis in the mandibular head. *Materials* [Internet]. 2022 Jan 18;15(3):711. Available from: <https://doi.org/10.3390/ma15030711>.
 41. Santos V, Uddin MdS, Hall C. Mechanical surface Treatments for controlling surface integrity and corrosion resistance of MG alloy implants: a review. *Journal of Functional Biomaterials* [Internet]. 2023 Apr 24;14(5):242. Available from: <https://doi.org/10.3390/jfb14050242>.
 42. Wang L, He J, Yu J, Arthanari S, Lee HS, Zhang H, et al. Review: Degradable magnesium corrosion control for implant applications. *Materials* [Internet]. 2022 Sep 6;15(18):6197. Available from: <https://doi.org/10.3390/ma15186197>.
 43. Poinern, Eddy & Brundavanam, Sridevi & Fawcett, Derek. (2012). *Biomedical Magnesium Alloys: A Review of Material Properties, Surface Modifications and Potential as a Biodegradable Orthopaedic Implant*. *American Journal of Biomedical Engineering*. 2. 218-240.