

Diplomarbeit

**AUFBAU EINES 3D KNOCHENMODELLS ZUR IN VITRO
TESTUNG DEGRADIERBARER MATERIALIEN**

eingereicht von

Lukas Karner

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klinik für Orthopädie und orthopädische Chirurgie

unter der Anleitung von

Dr. rer. nat. Claudia Kleinhans

OÄ Priv.-Doz. Dr. med. univ. Tanja Kraus

Graz, 03.02.17

Eidesstattliche Erklärung

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, 03.02.17

Lukas Karner eh.

.....
Lukas Karner

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, die mir bei der Erstellung meiner Diplomarbeit unterstützend zur Seite standen.

Zu Beginn möchte ich Frau Dr. Claudia Kleinhans meinen Dank für die Bereitstellung der Thematik und ihre ausgezeichnete Betreuung während der Arbeit aussprechen. Ich möchte dir dabei besonders für die Einführung in die Methoden der Zellforschung und Arbeit im Labor danken, welcher ich stets mit Begeisterung nachgegangen bin.

Mein nächster Dank gebührt allen Hüftkopfspendern und Hüftkopfspenderinnen für die Bereitstellung ihrer Hüftkopfresektate, die im Zuge einer Hüfttotalendoprothesenoperation entnommen wurden. Ohne Sie wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Im Zuge dessen möchte ich mich auch herzlich bei Herrn OA Dr. Werner Maurer-Ertl, der die oben genannten Operationen durchgeführt hat, für die problemlose Übergabe der Resektate bedanken.

Ein weiteres Dankeschön möchte ich Frau Priv.-Doz. Dr. Tanja Kraus und Frau Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. Annelie Weinberg für deren hilfreiche Anregungen beim Korrekturlesen meiner Arbeit ausrichten.

Ein besonderer Dank gebührt schließlich meinen Eltern, die mich während meiner gesamten Studienzeit moralisch und finanziell unterstützt haben. Ihr wart mir stets ein Vorbild und immer für mich da. Überdies wäre mir die Absolvierung meines Studiums ohne eure Unterstützung nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

1	GLOSSAR UND ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	7
3	TABELLENVERZEICHNIS.....	10
4	ZUSAMMENFASSUNG.....	11
5	ABSTRACT.....	12
6	EINLEITUNG.....	13
7	MATERIAL UND METHODEN.....	18
7.1	VERWENDETE MATERIALIEN	18
7.1.1	<i>Verwendete Geräte.....</i>	<i>18</i>
7.1.2	<i>Verwendete Verbrauchsmaterialien.....</i>	<i>18</i>
7.1.3	<i>Verwendete Substanzen.....</i>	<i>19</i>
7.1.4	<i>Verwendete Nährmedien und Lösungen.....</i>	<i>20</i>
7.2	DURCHGEFÜHRTE METHODEN	21
7.2.1	<i>Allgemeines</i>	<i>21</i>
7.2.2	<i>Isolation von humanen Stammzellen aus Hüftkopfknochenstücken</i>	<i>21</i>
7.2.3	<i>Passagieren der humanen mesenchymalen Stammzellen.....</i>	<i>23</i>
7.2.4	<i>Einfrieren der hMSCs</i>	<i>24</i>
7.2.5	<i>Zellen auftauen.....</i>	<i>24</i>
7.2.6	<i>Durchführung der osteogenen Differenzierung der hMSCs</i>	<i>25</i>
7.2.7	<i>Kultivierung von hMSCs in einem 3-dimensionalen (3D) Kollagengel.....</i>	<i>25</i>
7.2.8	<i>Osteogene Differenzierung der hMSCs in einem 3D Kollagengel.....</i>	<i>26</i>
7.2.9	<i>Lebend/Tod-Färbung der Zellen in einer 48-Well Platte.....</i>	<i>27</i>
7.2.10	<i>Alizarinrot-Färbung der Zellen in einer 48-Well Platte</i>	<i>28</i>
7.2.11	<i>Aufbau von 3D Gelen inklusive Implantaten (Mg10Gd, Ti)</i>	<i>30</i>
7.2.12	<i>Untersuchung der Implantate mittels μCT-Scans</i>	<i>30</i>
8	ERGEBNISSE – RESULTATE.....	32
8.1	EVALUIERUNG DES ISOLATIONSVORGANGES VON hMSCs AUS HUMANEN FEMURKÖPFEN MITTELS LICHTMIKROSKOPIE	32
8.2	EVALUIERUNG DER ZELLVIABILITÄT MITTELS LEBEND/TOD-FÄRBUNG.....	37
8.3	EVALUIERUNG DER OSTEOGENEN DIFFERENZIERUNG MITTELS ALIZARINROT-FÄRBUNG.....	43
8.4	EVALUIERUNG DES IMPLANTATABBAUVERHALTENS MITTELS μ CT-SCANS	49
8.5	EVALUIERUNG DES EINWACHSVERHALTENS DER IMPLANTATE MITTELS PULL-OUT TESTUNG.....	59
9	DISKUSSION.....	60
10	LITERATURVERZEICHNIS.....	65

1 Glossar und Abkürzungsverzeichnis

Begriffe	Erklärung
adhärent	an eine Oberfläche anhaftend
Arthritis	Gelenksentzündung
biodegradierbar	biologisch abbaubar
biokompatibel	Stoffe, die keinen negativen Einfluss auf lebende Gewebe haben
biostabil	nicht biologisch abbaubar
Chevron-Osteotomie	Operation, bei der das Metatarsalköpfchen verschoben wird
CryoTubes	Einfrierröhrchen
Degradation	Verlust von Materialeigenschaften bzw. Stoffabbau
degradierbar	selbst auflösend
Differenzierung	Entwicklung von Zellen oder Geweben
DonorIn	SpenderIn
ex vivo	außerhalb des Lebendigen
extrazelluläre Matrix	Gesamtheit aller Makromoleküle im Interzellularraum
Femurkopf	Bestandteil des Oberschenkelknochens
Fluoreszenz	spontane Abgabe von Licht
Hallux valgus	Abweichung der Großzehe im Grundgelenk nach kleinzehenwärts
Hemithorax	eine Seite des Brustkorbes
Hydrogen	Wasserstoff
Hydrogen gas	Wasserstoffgas
in vitro	im Glas, d.h. außerhalb des lebenden Organismus
in vivo	im Lebendigen, d.h. innerhalb des lebenden Organismus
Ischämie	verminderte oder aufgehobene Durchblutung
Kalzifizierung	Einlagerung von Calcium
kultivieren	züchten
makroskopisch	mit freiem Auge sichtbar
mesenchymale Stammzelle	Vorläuferzelle
Morphologie	Gestalt lebender Organismen oder ihrer Bestandteile
multizellulär	aus vielen Zellen bestehend
Nekrosezeichen	Zeichen für den Tod einer Zelle
Osteoblasten	spezialisierte Knochenzellen, die für die Bildung von Knochengewebe verantwortlich sind
osteogen	knochenbildend bzw. vom Knochen ausgehend
Osteolyse	Knochenabbau
passagieren	subkultivieren bzw. "splitten"
pathophysiologisch	krankhafte Veränderungen im Körper
physiologisch	normale Veränderungen im Körper
Polyglycoside	Verbindung aus Zuckern und fetten Alkoholen
Poly lactide	Verbindung aus vielen Milchsäuremolekülen
präklinisch	vor der Anwendung am Menschen
primär	zuerst vorhanden, ursprünglich
pull-out	Herausziehen
resuspendieren	erneute Vermischung von bereits ausgefallenen Teilchen

stress-shielding	Reduktion der Knochendichte aufgrund von Belastungsmangel des Knochens wegen eines Implantats
undifferenziert	keine verschiedenen Abstufungen aufweisend
Zellviabilität	Zelllebensfähigkeit, Lebendzellanteil
Zellisolation	Abtrennung von ausgewählten Zellen aus einem Gewebe
Zellpellet	Ansammlung von Zellen

Tabelle 1: Glossar

Abkürzung	Vollform
2D	2-dimensional
3D	3-dimensional
ACC	Accutase
C ₁₄ H ₇ NaO ₇ S	Alizarin rot
C ₂ H ₄ O ₂	Ameisensäuremethylester
CH ₃ COONa	Natriumacetat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
diff.	differenziert
FBS	fetal bovine serum
H ₂ O	Wasser
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
hMSC	humane mesenchymale Stammzelle
hMSC	osteogenes Differenzierungsmedium
hMSCs	humane mesenchymale Stammzellen
L-Glut	L-Glutamin
MCGS	mesenchymal cell growth supplement
Mg	Magnesium
Mg10Gd	Magnesium 10 Gadolinium
MSCBM	mesenchymal stem cell basal medium
n	Anzahl
NaOH	Natriumhydroxyd
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
Pen / Strep	Penicillin / Streptomycin
T175	175 cm ² Zellkulturflasche
T75	75 cm ² Zellkulturflasche
Ti	Titan
undiff.	undifferenziert
x g	Umdrehungen
μCT	Mikro-Computertomographie
Ø	Durchmesser

Tabelle 2: Abkürzungsverzeichnis

2 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: BERECHNUNG DER ZUSAMMENSETZUNG DES KOLLAGENGELS (“COLLAGEN I RAT PROTEIN, TAIL - THERMO FISHER SCIENTIFIC,” N.D.)	26
ABBILDUNG 2: ARBEITSSCHRITTE	31
ABBILDUNG 3: DIE LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHME 2 TAGE NACH ZELLISOLATION ZEIGT ADHÄRENTE POTENZIELLE STAMMZELLEN (GRÜN) UND NICHT ADHÄRENTE ZELLEN / BLUTKÖRPERCHEN (ROT); DONORIN 3 – PASSAGE 0	32
ABBILDUNG 4: DIE LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHME 2 TAGE NACH ZELLISOLATION ZEIGT ADHÄRENTE ZELLEN (GRÜN) UND NICHT ADHÄRENTE ZELLEN / BLUTKÖRPERCHEN (ROT); DONORIN 1 – PASSAGE 0	33
ABBILDUNG 5: 7 TAGE NACH ZELLISOLATION ZEIGT DIE LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHME EINE VERMEHRUNG DER ADHÄRENTEN ZELLEN (GRÜN). AUCH BLUTKÖRPERCHEN (ROT) SIND ZU SEHEN; DONORIN 1 – PASSAGE 0	33
ABBILDUNG 6: IN DIESER LICHTMIKROSKOPISCHEN AUFNAHME 7 TAGE NACH ZELLISOLATION SIND VERMEHRT ADHÄRENTE ZELLEN (GRÜN), SOWIE BLUTKÖRPERCHEN (ROT) ZU SEHEN; DONORIN 2 – PASSAGE 0	34
ABBILDUNG 7: 14 TAGE NACH ZELLISOLATION ZEIGT DIESE LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHME GROßFLÄCHIG ADHÄRENTE POTENZIELLE STAMMZELLEN; DONORIN 2 – PASSAGE 0	34
ABBILDUNG 8: DIESE LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHME 14 TAGE NACH ZELLISOLATION ZEIGT GROßFLÄCHIG ADHÄRENTE ZELLEN; DONORIN 1 – PASSAGE 0	35
ABBILDUNG 9: IN DIESER LICHTMIKROSKOPISCHEN AUFNAHME 14 TAGE NACH ZELLISOLATION ZEIGEN DIE ADHÄRENTEN ZELLEN EINE STERNFÖRMIGE ZELLSTRUKTUR MIT ZENTRALEM KERN; DONORIN 1 – PASSAGE 0	35
ABBILDUNG 10: DIESE LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHME 14 TAGE NACH ZELLISOLATION ZEIGT ADHÄRENTE ZELLEN IN EINER STERNFÖRMIGEN ZELLSTRUKTUR MIT ZENTRALEM KERN; DONORIN 2 – PASSAGE 0	36
ABBILDUNG 11: DIESE FLUORESCENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME AN TAG 1 IN 2D KONTROLLZELLKULTUR ZEIGT LEBENDE hMSCs (GRÜN) UND TOTE ZELLEN (ROT, PFEIL) NACH LEBEND/TOD-FÄRBUNG; DONORIN 1 – PASSAGE 1	37
ABBILDUNG 12: DIESE FLUORESCENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME AN TAG 1 IM 3D GEL ZEIGT EINE LEBENDE hMSC (GRÜN) NACH LEBEND/TOD-FÄRBUNG; DONORIN 1 – PASSAGE 1	38
ABBILDUNG 13: DIESE FLUORESCENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME NACH 7 TAGEN 2D KONTROLLZELLKULTUR ZEIGT EINE ZUNAHME LEBENDER hMSCs (GRÜN) NACH LEBEND/TOD-FÄRBUNG; DONORIN 2 – PASSAGE 1	38
ABBILDUNG 14: DIESE FLUORESCENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME NACH 7 TAGEN ZELLKULTUR IM 3D MODELL ZEIGT EINE LEBENDE hMSC (GRÜN) NACH LEBEND/TOD-FÄRBUNG; DONORIN 2 – PASSAGE 1 ..	39
ABBILDUNG 15: DIESE FLUORESCENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME NACH 14 TAGEN 2D KONTROLLZELLKULTUR ZEIGT EINE WEITERE VERMEHRUNG LEBENDER hMSCs (GRÜN), SOWIE EINE TOTE hMSC (ROT - PFEIL) NACH LEBEND/TOD-FÄRBUNG; DONORIN 2 – PASSAGE 1	39
ABBILDUNG 16: DIESE FLUORESCENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME NACH 14 TAGEN 2D KONTROLLZELLKULTUR ZEIGT EINE WEITERE VERMEHRUNG LEBENDER hMSCs (GRÜN), SOWIE EINZELNE TOTE hMSCs (ROT - PFEILE) NACH LEBEND/TOD-FÄRBUNG; DONORIN 1 – PASSAGE 1	40
ABBILDUNG 17: DIESE FLUORESCENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME NACH 14 TAGEN ZELLKULTUR IM 3D GEL ZEIGT LEBENDE hMSCs (GRÜN) NACH LEBEND/TOD-FÄRBUNG; DONORIN 1 – PASSAGE 1	40
ABBILDUNG 18: DIESE FLUORESCENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME NACH 14 TAGEN ZELLKULTUR IM 3D GEL ZEIGT LEBENDE hMSCs (GRÜN), SOWIE TOTE hMSCs (ROT) NACH LEBEND/TOD-FÄRBUNG; DONORIN 1 –PASSAGE 1	41
ABBILDUNG 19: DIESE FLUORESCENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME NACH 14 TAGEN ZELLKULTUR IM 3D GEL ZEIGT LEBENDE hMSCs (GRÜN) NACH LEBEND/TOD-FÄRBUNG; DONORIN 2 – PASSAGE 1	41

ABBILDUNG 20: MAKROSKOPISCHER NACHWEIS DER OSTEOGENEN DIFFERENZIERUNG (UNTERE REIHE) MITTELS ALIZARINROTFÄRBUNG AN TAG 14; DONORINNEN 1 UND 2.....	43
ABBILDUNG 21: MAKROSKOPISCHER NACHWEIS DER OSTEOGENEN DIFFERENZIERUNG (UNTERE REIHE) MITTELS ALIZARINROTFÄRBUNG AN TAG 14; DONORINNEN 3 UND 6.....	43
ABBILDUNG 22: LICHTMIKROSKOPISCHE BESTÄTIGUNG DER OSTEOGENEN DIFFERENZIERUNG MITTELS ALIZARINROTFÄRBUNG (KREIS) NACH 7 TAGEN 2D ZELLKULTUR; DONORIN 3 – PASSAGE 2	44
ABBILDUNG 23: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHME DER KONTROLL-ALIZARINROTFÄRBUNG IN MSCBM (KEINE DIFFERENZIERUNG) NACH 7 TAGEN 2D ZELLKULTUR; DONORIN 3 – PASSAGE 2.....	44
ABBILDUNG 24: LICHTMIKROSKOPISCHE BESTÄTIGUNG DER OSTEOGENEN DIFFERENZIERUNG DER hMSCs (KREIS) MITTELS ALIZARINROTFÄRBUNG NACH 7 TAGEN ZELLKULTUR IM 3D GEL; DONORIN 6 – PASSAGE 2	45
ABBILDUNG 25: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHME DER KONTROLL-ALIZARINROTFÄRBUNG DER hMSCs IM 3D GEL 7 TAGE KULTIVIERT OHNE DIFFERENZIERUNGSMEDIUM; DONORIN 6 – PASSAGE 2 ...	45
ABBILDUNG 26: LICHTMIKROSKOPISCHE BESTÄTIGUNG DER OSTEOGENEN DIFFERENZIERUNG DER hMSCs MITTELS ALIZARINROTFÄRBUNG NACH 14 TAGEN 2D ZELLKULTUR; DONORIN 6 – PASSAGE 2 ..	46
ABBILDUNG 27: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHME DER KONTROLL-ALIZARINROTFÄRBUNG DER UNDIFFERENZIIERTEN hMSCs NACH 14 TAGEN 2D ZELLKULTUR; DONORIN 6 – PASSAGE 2	46
ABBILDUNG 28: LICHTMIKROSKOPISCHE BESTÄTIGUNG DER OSTEOGENEN DIFFERENZIERUNG DER hMSCs MITTELS ALIZARINROTFÄRBUNG NACH 14 TAGEN ZELLKULTUR IM 3D GEL MIT OSTEOGENEM DIFFERENZIERUNGSMEDIUM; DONORIN 2 – PASSAGE 2.....	47
ABBILDUNG 29: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHME DER KONTROLL-ALIZARINROTFÄRBUNG DER hMSCs, DIE 14 TAGE IM 3D GEL OHNE DIFFERENZIERUNGSMEDIUM KULTIVIERT WURDEN; DONORIN 2 – PASSAGE 2	48
ABBILDUNG 30: VERGLEICH DER STÖREFFEKTE VON MG-IMPLANTATEN (OBEN) MIT TI-IMPLANTATEN (MITTE) UND EINEM IMPLANTATFREIEM GEL (UNTEN) IN EINEM μ CT-SCHNITTBILD.....	49
ABBILDUNG 31: DIE μ CT-AUFNAHME NACH 1 TAG ZELLKULTUR IM 3D GEL MIT OSTEOGEN DIFF. hMSCs ZEIGT EINE BLASENBILDUNG BEI MG (LINKS), KLEINE LUFTBLASEN BEI TI (MITTE) SOWIE IMPLANTATFREIEM GEL (RECHTS); DONORIN 5 – PASSAGE 3	50
ABBILDUNG 32: DIE μ CT-AUFNAHME NACH 1 TAG ZELLKULTUR IM 3D GEL MIT UNDIFF. hMSCs ZEIGT EINE BLASENBILDUNG BEI MG (LINKS), KLEINE LUFTBLASEN BEI TI (MITTE) SOWIE IMPLANTATFREIEM GEL (RECHTS); DONORIN 6 – PASSAGE 3.....	50
ABBILDUNG 33: DIE μ CT-AUFNAHME NACH 13 TAGEN ZELLKULTUR IM 3D GEL MIT OSTEOGEN DIFF. hMSCs ZEIGT EINE BLASENBILDUNG BEI MG (RECHTS), KLEINE LUFTBLASEN BEI TI (MITTE) SOWIE IMPLANTATFREIEM GEL (LINKS); DONORIN 5 – PASSAGE 3	51
ABBILDUNG 34: DIE μ CT-AUFNAHME NACH 13 TAGEN ZELLKULTUR IM 3D GEL MIT UNDIFF. hMSCs ZEIGT EINE BLASENBILDUNG BEI MG (LINKS), KLEINE LUFTBLASEN BEI TI (MITTE) SOWIE IMPLANTATFREIEM GEL (RECHTS); DONORIN 6 – PASSAGE 3	51
ABBILDUNG 35: DIE MAKROSKOPISCHE AUFNAHME NACH 13 TAGEN ZELLKULTUR IM 3D GEL MIT UNDIFF. hMSCs ZEIGT EINE DEUTLICHE BLASENBILDUNG IM 3D GEL MIT MG-IMPLANTAT; DONORIN 6 – PASSAGE 3	52
ABBILDUNG 36: DIE MAKROSKOPISCHE AUFNAHME NACH 13 TAGEN ZELLKULTUR IM 3D GEL MIT OSTEOGEN DIFF. hMSCs ZEIGT EINE DEUTLICHE BLASENBILDUNG BEI DEN 3D GELEN MIT MG-IMPLANTATEN, SOWIE LUFTBLASEN IN DEN GELEN MIT TI-IMPLANTATEN UND IN DEN IMPLANTATFREIEN GELEN; DONORINNEN 4, 5, 6 (VON OBEN NACH UNTEN) – PASSAGE 3	52
ABBILDUNG 37: DAS μ CT-SCHNITTBILD AN TAG 1 ZEIGT EINEN HÖHENVERGLEICH DER 3D GELE MIT DIFF. hMSCs MIT MG-IMPLANTAT (OBEN), TI-IMPLANTAT (MITTE) UND EINEM IMPLANTATFREIEM GEL (UNTEN); DONORINNEN 5, 6, 4 (VON LI. NACH RE.) – PASSAGE 3	54
ABBILDUNG 38: DAS μ CT-SCHNITTBILD AN TAG 13 ZEIGT EINEN HÖHENVERGLEICH DER 3D GELE MIT DIFF. hMSCs MIT MG-IMPLANTAT (UNTEN), TI-IMPLANTAT (MITTE) UND EINEM IMPLANTATFREIEM GEL (OBEN); DONORINNEN 4, 5, 6 (VON LI. NACH RE.) – PASSAGE 3	55

ABBILDUNG 39: DAS μ CT-SCHNITTBILD AN TAG 1 ZEIGT EINEN HÖHENVERGLEICH DER 3D GELE MIT UNDIFF. hMSCs MIT MG-IMPLANTAT (OBEN), Ti-IMPLANTAT (MITTE) UND EINEM IMPLANTATFREIEN GEL (UNTEN); DONORIN 6 – PASSAGE 3.....	55
ABBILDUNG 40: DAS μ CT-SCHNITTBILD AN TAG 13 ZEIGT EINEN HÖHENVERGLEICH DER 3D GELE MIT UNDIFF. hMSCs MIT MG-IMPLANTAT (UNTEN), Ti-IMPLANTAT (MITTE) UND EINEM IMPLANTATFREIEN GEL (OBEN); DONORIN 6 – PASSAGE 3.....	55
ABBILDUNG 41: VERGLEICH DER DEGRADATION VON MG-IMPLANTEN (OBEN) MIT Ti-IMPLANTATEN (UNTEN) AN TAG 1 IN 3D MODELLEN MIT OSTEOGEN DIFF. ZELLEN MIT HILFE EINER 3D REKONSTRUKTION DER IMPLANTATE; DONORINNEN 4, 5, 6 (VON LI. NACH RE.) – PASSAGE 3	56
ABBILDUNG 42: VERGLEICH DER DEGRADATION EINES MG-IMPLANTES (UNTEN) MIT EINEM Ti-IMPLANTAT (OBEN) AN TAG 1 IN EINEM 3D MODELL MIT UNDIFF. ZELLEN MIT HILFE EINER 3D REKONSTRUKTION DER IMPLANTATE; DONORIN 6 – PASSAGE 3	57
ABBILDUNG 43: VERGLEICH DER DEGRADATION VON MG-IMPLANTEN (OBEN) MIT Ti-IMPLANTATEN (UNTEN) AN TAG 13 IN 3D MODELLEN MIT OSTEOGEN DIFF. ZELLEN MIT HILFE EINER 3D REKONSTRUKTION DER IMPLANTATE; DONORINNEN 4, 5, 6 (VON LI. NACH RE.) – PASSAGE 3	57
ABBILDUNG 44: VERGLEICH DER DEGRADATION VON MG-IMPLANTEN (RECHTS) MIT Ti-IMPLANTATEN (LINKS) AN TAG 13 IN 3D MODELLEN MIT UNDIFF. ZELLEN MIT HILFE EINER 3D REKONSTRUKTION DER IMPLANTATE; DONORIN 6 – PASSAGE 3	57
ABBILDUNG 45: DIE MAKROSKOPISCHE AUFNAHME AN TAG 13 ZEIGT EINE DEUTLICHE DEGRADATION DER MG-STÄBE IM 3D GEL MIT OSTEOGEN DIFF. (LI) UND UNDIFF. (RE) ZELLEN; DONORIN 6 – PASSAGE 3	58
ABBILDUNG 46: DIE MAKROSKOPISCHE AUFNAHME AN TAG 13 ZEIGT KEINERLEI DEGRADATIONSANZEICHEN DER Ti-STÄBE IN DEN 3D GELEN MIT OSTEOGEN DIFF. (LI) BZW. UNDIFF. (RE) ZELLEN; DONORIN 6 – PASSAGE 3	58

3 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: GLOSSAR	6
TABELLE 2: ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
TABELLE 3: GERÄTE INKLUSIVE HERSTELLER.....	18
TABELLE 4: VERBRAUCHSMATERIALIEN INKLUSIVE HERSTELLER	18
TABELLE 5: SUBSTANZEN INKLUSIVE HERSTELLER	19
TABELLE 6: NÄHRMEDIEN INKLUSIVE ZUSAMMENSETZUNG	20
TABELLE 7: LÖSUNGEN INKLUSIVE ZUSAMMENSETZUNG.....	20
TABELLE 8: HÖHE DER GELE MIT OSTEOGEN DIFF. hMSCs UND MIT MG10GD-IMPLANTATEN AN TAG 1 UND 13..	53
TABELLE 9: HÖHE DER GELE MIT OSTEOGEN DIFF. hMSCs UND MIT Ti-IMPLANTATEN AN TAG 1 UND 13	53
TABELLE 10: HÖHE DER GELE MIT OSTEOGEN DIFF. hMSCs OHNE IMPLANTATE AN TAG 1 UND 13	53

4 Zusammenfassung

Neu entwickelte Implantatwerkstoffe erfordern eine präklinische Testung, die heutzutage fast ausschließlich an Tiermodellen erfolgt. Da diese Unterschiede zum menschlichen Körper aufweisen und ihre Durchführung strenger Indikation unterliegt, beschäftigen sich Forscher mit der Entwicklung von im Labor hergestellten („*in vitro*“) Testsystemen.

Ziel der Arbeit war es, ein dreidimensionales (3D) humanes Knochenmodell aus humanen Femurkopfknochenspenden und Kollagengel aufzubauen. Mit diesem sollte die Wechselwirkung zwischen Material (Magnesium 10 Gadolinium [Mg10Gd], Titan [Ti]) und umliegendem Gewebe untersucht werden. Hierbei interessierte uns insbesondere, ob das entwickelte 3D Modell eine Untersuchung der Degradation des Implantatmaterials, verglichen mit einem implantatfreien Modell, ermöglicht.

Im 3D Knochenmodell wurde die Zellviabilität humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSCs) mittels einer Lebend/Tod-Färbung nach 1, 7 und 14 Tagen untersucht, um festzustellen, ob die hMSCs über die geplante Untersuchungsdauer überlebensfähig sind. Auch wurde die Fähigkeit der hMSCs, sich im 3D Modell osteogen zu differenzieren, mit Hilfe der Alizarinrot-Färbung nach 7 und 14 Tagen evaluiert. Abschließend wurde das Abbauverhalten der Implantate im entwickelten Knochenmodell mit mikrocomputertomographischen (μ CT) Untersuchungen nach 1 bzw. 13 Tagen beobachtet.

Pro humaner Femurkopfspende (2 weiblich, 4 männlich; Alter zwischen 53 und 81 Jahren) konnten ungefähr 2 Millionen hMSCs erfolgreich isoliert werden. Mittels Lebend/Tod-Färbung wurde gezeigt, dass diese 14 Tage lang sowohl in einer zweidimensionalen (2D) Kultur, als auch im 3D Knochenmodell eine ausgezeichnete Überlebensrate aufweisen. Weiter ließen sich die hMSCs in der 2D Zellkultur und im 3D Modell problemlos in Osteoblasten differenzieren. Dabei nahm das Ausmaß der Differenzierung und der damit verbundenen Kalzifizierung von Tag 7 bis 14 deutlich zu, was mit Hilfe der Alizarinrot-Färbung nachgewiesen wurde. In den μ CT-Bildern zeigten die Titanimplantate gravierende Störeffekte über etwa $\frac{2}{3}$ der 3D Modellfläche. Diese fielen bei der Gruppe mit Magnesium-Implantaten geringer aus und waren bei den implantatfreien Kontrollen nicht nachweisbar. In den Scans war die Degradation der biodegradierbaren Mg10Gd-Implantate unter Hydrogengasbildung sichtbar. Die klinisch etablierten, biostabilen Ti-Implantate zeigten keinen Materialverlust im Untersuchungszeitraum.

5 Abstract

Novel developed materials for implantation into bones require preclinical testings, which are almost always performed in test animals. Because animals show some significant differences compared to the human body and their implementation is subject to strict indications, researchers are trying to develop laboratory-based ("in vitro") testing systems.

The goal of the present study was to develop a three-dimensional (3D) human bone model in a collagen gel. Cells were received from explanted human femoral heads. The interaction between two different materials (magnesium 10 gadolinium [Mg10Gd], titanium [Ti]) and these cells embedded in a collagen gel was tested with a main focus on material degradation. The results were compared to a collagen gel without materials.

The cell viability of human mesenchymal stem cells (hMSCs) was investigated in the 3D model with live/dead staining after 1, 7 and 14 days. Moreover, the ability of the hMSCs to differentiate into osteoblasts was evaluated by using Alizarin red staining after 7 and 14 days. The degradation behaviour of the implants in the developed bone model was studied by μ CT scans after 1 and 13 days.

Approximately 2 million hMSCs could be successfully isolated from each human femoral head. (Donors: 2 female, 4 male; age range from 53 to 81). Almost all of the explanted cells survived 14 days in a 2D culture and also in a 3D bone model, which could be shown by live/death staining. Furthermore, the hMSCs differentiated into osteoblasts in the two-dimensional (2D) cell culture and the 3D model. Differentiation and the associated calcification increased significantly from day 7 to 14, which was demonstrated by Alizarin red stainings. In the micro computed tomography (μ CT) images, the titanium implants showed severe disturbance effects. These effects were reduced in the magnesium implant group and not detectable in the implant-free controls. The degradation of the biodegradable Mg10Gd-implants was clearly presented in the scans. In contrast, there was no loss of material in Ti-implants during the whole investigation period.

6 Einleitung

Hintergrund und Ziel:

Neu entwickelte Implantatwerkstoffe erfordern eine präklinische Testung, die heutzutage fast ausschließlich an Tiermodellen erfolgt. Da diese Unterschiede zum menschlichen Körper aufweisen und ihre Durchführung strenger Indikation unterliegt, beschäftigen sich Forscher seit einigen Jahren mit der Entwicklung von im Labor hergestellten („in vitro“) Testsystemen. Mit deren Hilfe soll die Anzahl der notwendigen Tierversuche, um erste Aussagen über die Eignung der entwickelten Materialien im physiologischen Milieu treffen zu können, stark reduziert werden. Außerdem besteht die Möglichkeit, mit solchen Testsystemen neu entwickelte Implantate an humanen Zellen zu testen, wodurch man sich genauere Vorhersagen in Bezug auf Implantatverträglichkeit / Implantatreaktionen erhofft.

Da diese „in vitro“ Testsysteme nach derzeitigem Stand der Wissenschaft noch nicht zufriedenstellend sind, wurde im ersten Teil dieser Arbeit versucht ein geeignetes 3-dimensionales (3D) „in vitro“ Knochenmodell, basierend auf primären humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) und einem Kollagengel, herzustellen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde überprüft, ob dieses Modell dazu geeignet ist, das Verhalten von zwei verschiedenen Implantatwerkstoffen (Magnesium 10 Gadolinium [Mg10Gd], Titan [Ti]) in den ersten beiden Wochen zu untersuchen. Als Kontrollgruppe diente dabei ein implantatfreies Knochenmodell.

Problematik präklinischer Tierversuche:

Um die sich abspielenden physiologischen und pathophysiologischen zellulären Prozesse im Knochen zu untersuchen, erweisen sich Tiermodelle oft nicht als zufriedenstellend (Papadimitropoulos et al., 2011). Zu den hohen Kosten und dem großen Grad an systemischer Komplexität spiegeln sie oft nicht die biologischen Gegebenheiten der Menschen wieder und versagen bei der Vorhersage der klinischen Ergebnisse (Papadimitropoulos et al., 2011).

Notwendigkeit guter „in vitro“ Testmodelle:

Aus den oben genannten Gründen sind gute „in vitro“ Modelle dringend erforderlich. Die Vorteile von „in vitro“ Testsystemen bestehen darin, dass Untersuchungen im Vergleich zu Tierversuchen preiswert, schneller durchführbar, und sehr gut standardisierbar sind (Neidlinger-Wilke, 2006). Außerdem ist es möglich, sehr große Probenzahlen parallel zu testen und statistisch auszuwerten (Neidlinger Wilke, 2006).

Bis dato wurde jedoch noch kein zufriedenstellendes „in vitro“ Modell entwickelt. Myrissa et al. 2016 verglichen in ihrer Arbeit die Degradationsraten verschiedener Magnesium-Implantate (Mg2Ag, Mg10Gd, Mg) „in vitro“ und „in vivo“. Dabei sahen sie vor allem in der ersten Woche gering höhere „in vitro“ Degradationsraten verglichen mit jenen „in vivo“ (Myrissa et al., 2016). Sie kamen zu dem Schluss, dass das durchgeführte systematische Experiment zeigt, dass eine Korrelation zwischen „in vivo“ und „in vitro“ immer noch Grenzen aufweist (Myrissa et al., 2016).

Ebenso zeigten Martinez Sanchez et al. in ihrem Review, dass die Korrosionsraten „in vitro“ generell höher sind als „in vivo“ (Martinez Sanchez et al., 2015). Die Unterschiede zwischen „in vivo“ und „in vitro“ können dem Umstand zugeschrieben werden, dass es offensichtlich schwierig ist, die komplexen physiologischen „in vivo“ Bedingungen nachzuahmen (Martinez Sanchez et al., 2015). Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit für verbesserte und umfassendere „in vitro“ Modelle, die die „in vivo“ Bedingungen genauer simulieren.

2D oder 3D Modelle:

Aktuell lassen sich 2-dimensionale (2D) und 3-dimensionale (3D) „in vitro“ Modelle unterscheiden. In dieser Arbeit wurde ein 3D Modell aufgebaut, da diese in der derzeitigen Forschung aus folgenden Gründen bevorzugt werden: Die Gegebenheiten in 2D Kulturen unterscheiden sich sehr von den Gegebenheiten, denen Osteoblasten im „in vivo“ Gewebe (3D) ausgesetzt sind (Matthews et al., 2014). In 3D Modellen, die die physiologische Umgebung besser repräsentieren, waren die Zellen in der Lage, eine Morphologie anzunehmen, die der „in vivo“ ähnlicher ist, als in 2D Modellen (Matthews et al., 2014). Des Weiteren erlaubt die 3D Kultur mehr Zell-Zell Interaktionen (Matthews et al., 2014). 3D Konfigurationen sind überdies wichtig, um unser Verständnis von multizellulären sowie Zell-Matrix Interaktionen signifikant zu verbessern (Lai et al., 2013). Einfache (2D) Testsysteme können die komplexe Situation „in vivo“ (3D) nur schwer nachahmen (Myrissa et al., 2016).

Kollagengel als 3D Modell-Bestandteil:

Den folgenden Forschungsergebnissen nach zu urteilen, ist Kollagen ein vielversprechendes Material, dass zum Aufbau eines 3D „in vitro“ Modells verwendet werden kann: Kollagen ist ein Schlüsselbestandteil der extrazellulären Matrix von natürlichem Knochen und spielt in der Knochenregeneration eine große Rolle (Long et al., 2015). Die biologische Aktivität von Kollagen lässt hoffen, dass es ein vorteilhaftes Biomaterial für die Knochengewebeforschung und Entwicklung ist (Long et al., 2015). Typ I Kollagen Gele bieten für Osteoblasten ein

exzellentes Kultursystem, da die Zellen in einer 3D Struktur wachsen. (Matthews et al., 2014). Lai et al. beschreiben in ihrer Arbeit, dass durch osteogen differenzierte humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) in Typ I Kollagen eine knochenähnliche Mikroumgebung geschaffen werden konnte (Lai et al., 2013).

Permanente und abbaubare Implantate:

Nicht abbaubare Implantate, wie beispielsweise rostfreier Stahl und Titan, bereiten den PatientInnen auf lange Sicht gesehen Probleme. Diese können zu andauernder endothelialer Dysfunktion, permanenter physikalischer Irritation und chronisch inflammatorischen lokalen Reaktionen führen (Chen et al., 2014). Yao et al. und Lohmann et al. beschreiben, dass der Abrieb dieser permanenten Implantate zu entzündlichen Veränderungen führen kann (Lohmann et al., 2014; Yao et al., 2014). Weiter beobachteten Liu et al. die Entwicklung einer lokalen Osteoporose durch „stress-shielding“ Effekte (Liu et al., 2010). Özarslan et al. beschreiben in ihrem Fallbericht, dass ein Kirschner-Draht von der linken Hüfte in den rechten Hemithorax gewandert ist, was eine gefährliche aber sehr seltene Komplikation darstellt (Özarslan et al., 2014). Vor allem bei Kindern wachsen Implantate auch gelegentlich von der Einbringstelle weg. Zusätzlich können metallische Implantate bei radiologischen Untersuchungen, wie Röntgen, CT und MR, die bei Verlaufskontrollen verwendet werden, stören.

Aus diesen Gründen ist vielfach eine zweite Operation notwendig, um die permanenten Implantate zu entfernen. Allerdings ist diese mit möglichen Komplikationen verbunden. Durch die Explantation können abseits von zusätzlichen Kosten weitere Probleme, wie beispielsweise ein erhöhtes Infektionsrisiko auftreten. Außerdem entwickeln bis zu 20 % der Patienten nach Implantatentfernung neue (Langzeit)-Symptome, wie lokale Beschwerden und leichte Schmerzen (Gösling et al., 2004).

Aufgrund der oben angeführten Punkte wird intensiv an abbaubaren (biodegradierbaren) Implantat-Materialien geforscht. Derzeit lassen sich einige aus Polylactiden und Polyglycosiden, sowie Stents und eine Schraube aus Magnesium aufbauen („Herz-Weltpremiere in München,“ 2016; Ruffieux and Wintermantel, 2009; Syntellix AG, n.d.). Aktuell gilt Magnesium als vielversprechende Materialgrundlage. Es ist ein natürlicher Bestandteil des menschlichen Körpers und zeigt eine exzellente Biokompatibilität sowie geeignete mechanische Eigenschaften, um als orthopädisches Implantat verwendet zu werden (Cecchinato et al., 2015; Chen et al., 2014; Martinez Sanchez et al., 2015). Windhagen et al. untersuchten in einer prospektiven, randomisierten klinischen Pilotstudie an 26 PatientInnen,

ob Magnesiumschrauben (MgYREZr) äquivalent zu Standard-Titanschrauben (Ti) nach Chevron-Osteotomie bei mildem Hallux valgus sind. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen MgYREZr- und Ti-Schrauben gefunden – bei beiden Implantaten zeigten sich keine Fremdkörperreaktionen, Osteolyse oder systemische Entzündungsreaktionen (Windhagen et al., 2013). Die Gruppen (Mg vs. Ti) weisen keine signifikanten radiologischen oder laborchemischen Unterschiede auf (Windhagen et al., 2013). Die postoperativen Röntgenaufnahmen (Mg Implantate) zeigten keine Nekrosezeichen, keine Knochenerosionen aufgrund von Gashöhlen und keine fortschreitende Arthritis, die Heilungsrate lag bei 100 % (Windhagen et al., 2013). Biodegradierbare Implantate minimalisieren überdies auch stress-shielding Effekte (Liu et al., 2010).

Magnesium-Implantate weisen noch einige Nachteile auf. Eines der größten Probleme, welches Mg und Mg-Legierungen betrifft, ist der unvorhersehbare Abbau „in vivo“ (Martinez Sanchez et al., 2015; Myrissa et al., 2016). Die hohe elektrochemische Aktivität von Mg und die im Körper herrschenden Bedingungen (Temperatur, Ionenzusammensetzung, ...) beeinflussen das Korrosionsverhalten derartig, dass es nicht mehr berechenbar ist (Martinez Sanchez et al., 2015). Eine schnelle oder unkontrollierte Korrosion ist auch mit einer starken Hydrogen- und Ionenfreisetzung, sowie mit starken pH-Veränderungen verbunden, was wiederum zu unerwünschten biologischen Reaktionen führen kann (Martinez Sanchez et al., 2015; Myrissa et al., 2016). Ist das Blut lokal mit Hydrogen gesättigt, führt eine weitere Hydrogengasentwicklung zur Akkumulation des Gases in Gewebshöhlen, was wiederum zu Knochenischämie und Knochennekrose in der Implantatumgebung führen kann (Marukawa et al., 2015). Parallel dazu wird ein Verlust der mechanischen Stabilität beobachtet, bevor der Knochen komplett geheilt ist (Cecchinato et al., 2015; Martinez Sanchez et al., 2015; Marukawa et al., 2015; Windhagen et al., 2013). Die Herausforderung bei der Entwicklung von Mg-Implantaten besteht folglich darin, den Abbauprozess besser zu kontrollieren (Cecchinato et al., 2015). Aufgrund des unvorhersehbaren Korrosionsverhaltens und Verständnisses für die Gewebsantwort ist die Entwicklung von geeigneten Mg-Implantaten jedoch schwierig (Marukawa et al., 2015).

Ziel der Arbeit:

Die oben angeführten Punkte zeigen die Notwendigkeit geeigneter „in vitro“ Testsysteme auf, um rascher geeignetere biodegradierbare Implantate entwickeln zu können. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit ein dreidimensionales humanes Knochenmodell aus humanen

Femurkopfknochenspenden und Kollagengel aufgebaut. Anhand dessen wurde anschließend die Wechselwirkung zwischen Material (Mg10Gd, Ti) und umliegendem Gewebe untersucht. Hierbei interessierte uns insbesondere, ob das entwickelte 3D Modell eine Untersuchung der Degradation des Implantatmaterials, verglichen mit einem implantatfreien Modell ermöglicht.

Zum Aufbau des 3D Modells wurden zunächst Zellen aus primären humanen Resektat-Materialien (Femurköpfe; n = 6, davon 2 weiblich, 4 männlich; Alter 53 bis 81 Jahre, nach Hüfttotalendoprothese) isoliert. Die somit gewonnenen humanen mesenchymalen Stammzellen (durch Differenzierung in Osteoblasten mittels Alizarinrot-Färbung bestätigt) wurden dann mittels eines geeigneten Nährmediums kultiviert und anschließend in ein 3D Kollagengel eingebracht. Danach wurde in die 3D Knochenmodelle entweder ein biodegradierbares Magnesium-Implantat (Mg10Gd) oder ein nicht degradierbares Titan (Ti)-Implantat eingebracht. Schließlich wurde das Abbauverhalten der Implantate mittels μ CT-Scans evaluiert.

7 Material und Methoden

7.1 Verwendete Materialien

Auf den kommenden Seiten sind alle Materialien, die zur Durchführung dieser Diplomarbeit benötigt wurden, aufgelistet (Tabelle 1-5).

7.1.1 Verwendete Geräte

In Tabelle 1 werden alle verwendeten Geräte mit entsprechendem Hersteller aufgelistet.

Gerät	Hersteller
Siemens Inveon Micro CT	Siemens Medical Solutions, USA
Sterilwerkbank Biowizard silverline	Kojair Tech Oy, Deutschland
Sicherheitswerkbank HERAEUS HERAsafe KS	Kendro, Deutschland
Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskop Olympus IX51	Olympus, Österreich
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3 L-R	Kendro, Deutschland
Trocken- und Wärmeschrank	Binder, Deutschland
Tank mit flüssigem Stickstoff -196 °C	Messer, Österreich
Inkubations- / Inaktivierungsbad 1002	GFL, Österreich
Zellzählgerät Casy TTC	Omni Life Science, Deutschland
Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo Fisher, Österreich

Tabelle 3: Geräte inklusive Hersteller

7.1.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 2 werden alle Verbrauchsmaterialien mit entsprechendem Hersteller genannt.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Nunclon™ 48-Well Platten	Sigma-Aldrich, Österreich
Zellkulturflasche klein (75 cm ²) und groß (175 cm ²)	SPL Life Sciences, Korea
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	SPL Life Sciences, Korea
CryoTube™ Vials (1,8 ml)	Sigma-Aldrich, Österreich
Casy Cup Zellzählgefäß	Omni Life Science, Deutschland

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien inklusive Hersteller

7.1.3 Verwendete Substanzen

In der folgenden Tabelle (Tabelle 3) sind alle Substanzen mit entsprechendem Hersteller, die bei dieser Arbeit verwendet wurden, angeführt.

Substanz	Hersteller
MSCBM	Lonza, Schweiz
Differentiation Basal Medium - Osteogenic	Lonza, Schweiz
Dexamethason (PT-4109F)	Lonza, Schweiz
F oder E Ascorbate (PT-4111F)	Lonza, Schweiz
MCGS (PT-4134F)	Lonza, Schweiz
L-Glut (PT-4140F)	Lonza, Schweiz
Pen/Strep (PT-4133F)	Lonza, Schweiz
B-Glycerophosphate (PT-4110F)	Lonza, Schweiz
Minimum Essential Medium Eagle	Sigma-Aldrich, Österreich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Österreich
PBS	Thermo Fisher, Österreich
1N NaOH	Sigma-Aldrich, Österreich
Ethanol 99,8 % vergällt	Roth, Deutschland
ddH ₂ O	ZMF Graz, Österreich
Alizarinrot S, gepuffert pH 4,0	Baacklab, Deutschland
CASYton Isotonischer Messpuffer	Omni Life Science, Deutschland
Ethanol 99,8 % unvergällt	Roth, Deutschland
Calcein	Sigma-Aldrich, Österreich
Ethidium	Sigma-Aldrich, Österreich
Collagen I, Rat Tail	Life Technologies Corporation, Österreich
Isopropanol	Roth, Deutschland
Accutase (ACC)	ZMF Graz, Österreich

Tabelle 5: Substanzen inklusive Hersteller

7.1.4 Verwendete Nährmedien und Lösungen

In diesem Abschnitt sind alle verwendeten Nährmedien (Tabelle 4) und Lösungen (Tabelle 5) in deren Zusammensetzung zusammengestellt.

Medium	Zusammensetzung
Basismedium	500 ml Minimum Essential Medium Eagle + 50 ml FBS + 10 ml L-Glut + 5 ml Pen/Strep
„spezial“ Basismedium (MSCBM)	440 ml MSCBM + 5 ml Pen/Strep
Osteogenes Differenzierungsmedium (hMSC)	170 ml Differentiation Basal Medium - Osteogenic + 1 ml Dexamethason + 1 ml E-Ascorbate + 20 ml MCGS + 4 ml L-Glut + 2 ml Pen/Strep + 2 ml B-Glycerophosphate

Tabelle 6: Nährmedien inklusive Zusammensetzung

Lösung	Zusammensetzung
Lebend/Tod-Färbelösung	10 ml PBS + 20 µl Ethidium + 5 µl Calcein
Alizarinrot S, gepuffert pH 4,0	1000 ml/l H ₂ O + 5 g/l C ₁₄ H ₇ NaO ₇ S (Alizarinrot S) + 6,72 g/l CH ₃ COONa + 1,04 ml/l C ₂ H ₄ O ₂
50 %iger Ethanol	25 ml 99,8 %iger Ethanol + 25 ml ddH ₂ O
70 %iger Ethanol	70 ml 99,8 %iger Ethanol + 30 ml ddH ₂ O

Tabelle 7: Lösungen inklusive Zusammensetzung

7.2 Durchgeführte Methoden

7.2.1 Allgemeines

Da es in der Zellkultur von immenser Wichtigkeit ist unter sterilen Bedingungen zu arbeiten, um Kontaminationen jeglicher Art zu verhindern, wurden die Versuche unter den üblichen sterilen Kautelen durchgeführt.

Um für die geplanten Versuche ausreichend Zellen zur Verfügung zu haben, wurden diese meist 1-2 Wochen lang in Zellkulturflaschen mit Basismedium im Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C und einer Kohlendioxid (CO₂) Konzentration von 5 % kultiviert. Die kleine Zellkulturflasche (T75 cm² Kulturfläche) wurde dabei stets mit 10 ml Basismedium und die große (T175) mit 20 ml Basismedium gefüllt. Damit die Zellen zu jeder Zeit ausreichend mit Nährstoffen versorgt wurden, fand 2 Mal wöchentlich ein Mediumwechsel statt. Sobald 80 bis 90 % der Kulturfläche mit Zellen bedeckt waren, wurden die Zellen passagiert (siehe 7.2.3) und mit den Versuchen begonnen.

Die verwendeten Substanzen wurden je nach Herstellerbeschreibung gelagert. Vor den Versuchen wurden die verwendeten Nährmedien sowie die Accutase im Wasserbad auf 37 °C erhitzt.

7.2.2 Isolation von humanen Stammzellen aus Hüftkopfknochenstücken

Vorbereitung:

Pro Hüftkopf wurden 5 Zentrifugenröhrchen mit jeweils 50 ml Fassungsvermögen vorbereitet. Diese wurden mit ungefähr 35 ml PBS unter der Sterilbank befüllt und anschließend in den Operationssaal gebracht.

Der im Rahmen einer Hüfttotalendoprothesenoperation an der Abteilung für Orthopädie am Universitätsklinikum Graz entnommene Hüftkopf diente als Donor für die Gewinnung von Knochenzellen. Nach Beendigung der Operation wurden aus allen Bereichen des Hüftkopfes, der nach Entnahme steril abgelegt war, fünf etwa 5 x 2 x 2 cm große Knochenstücke herausgesägt. Jedes dieser Stücke wurde, wieder unter sterilen Bedingungen, in eines der vorbereiteten Zentrifugenröhrchen übergeführt. Danach wurden

die Röhren entweder umgehend abgeholt oder in einem Kühlschrank (4 °C) bis zur Abholung gelagert. Innerhalb der dann folgenden 24 Stunden wurde mit der Zellisolation begonnen. Humane mesenchymale Stammzellen wurden von 6 verschiedenen FemurkopfsponderInnen (2 weiblich, 4 männlich) im Alter zwischen 53 und 81 Jahren isoliert. Hierbei wurden 2 Isolationsmethoden durchgeführt und bezüglich der resultierenden Zellquantität evaluiert.

Isolation – Methode I:

Im Labor wurden die Knochenstücke unter der Sterilwerkbank mit einer sterilen Pinzette in frische 50 ml Zentrifugenröhren, die in Folge als Ausgangs(zentrifugen)röhren bezeichnet werden, transferiert. Dabei wurde stets ein Knochenstück in ein Röhren gegeben. Die Röhren wurden danach bis zur 50 ml Markierung mit PBS gefüllt. Anschließend wurden die Zentrifugenröhren etwa 5 Minuten lang per Hand geschüttelt, um die Stammzellen aus dem Knochen herauszuwaschen. Danach wurde die Flüssigkeit (PBS + Zellen) mittels 25 ml Stabpipetten und einer Pipettierhilfe in ein neues leeres Zentrifugenröhren überführt. Das Knochenstück blieb im Ausgangsröhren zurück. Nach diesem Vorgang hatte man nun 5 Ausgangszentrifugenröhren mit jeweils einem Knochenstück und 5 neue Röhren, die mit Flüssigkeit (PBS + Zellen) gefüllt waren. Letztere wurden zentrifugiert (270 x g, 5 min, 22 °C). Als nächstes wurde der Überstand mit einer Pipette abgesaugt, sodass nur noch das Zellpellet, welches sich durch die Zentrifugation am Boden des Röhrens gebildet hatte, zurück blieb. Das Zellpellet wurde anschließend mit 10 ml Basismedium resuspendiert. Mit der nun erhaltenen Zellsuspension wurde das Zellpellet des nächsten Zentrifugenröhrens resuspendiert usw. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis im letzten Zentrifugenröhren alle erhaltenen Zellen resuspendiert waren. Nachfolgend wurden die Ausgangsröhren wieder bis zur 50 ml Markierung mit PBS gefüllt und der oben beschriebene Vorgang wurde wiederholt. Insgesamt wurden die Knochenstücke 3 Mal gewaschen, sodass am Ende ein Zentrifugenröhren mit 30 ml Basismedium + Zellen übrig war. Dieses Röhren wurde dann abermals zentrifugiert (270 x g, 5 min, 22 °C). Der Überstand wurde wiederum abgesaugt und das nun erhaltene Zellpellet wurde mit 10 ml MSCBM (Stammzellkulturmedium) resuspendiert. Die Suspension (MSCBM Medium + Zellen) wurde sodann in eine Zellkulturflasche (T175) übergeführt. Danach wurden 10 ml MSCBM Kulturmedium hinzugefügt und die Flasche in den Inkubator (37 °C, 5 % CO₂)

gestellt. Nun wurde das Medium 2 Mal wöchentlich gewechselt, bis nach annähernd 2 Wochen ausreichend Zellen vorhanden waren.

Isolation – Methode II:

Bei dieser Methode verwendet man, im Gegensatz zu Methode I, anstatt des PBS das Basismedium. Der restliche Isolationsvorgang läuft bei beiden Methoden identisch ab.

Da bei der 1. Isolation mit Methode I und II ungefähr die gleiche Anzahl an Zellen resultierten, wurde in den folgenden Isolationen ausschließlich Methode I verwendet, da diese deutlich kostengünstiger ist.

7.2.3 Passagieren der humanen mesenchymalen Stammzellen

Sobald die Zellkulturflasche Großteils von Zellen bedeckt war (80-90 %), oder ein Versuch mit diesen Zellen gemacht werden sollte, mussten die Zellen passagiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) bis Passage 5 verwendet, um die Differenzierungskapazität zu gewährleisten.

Ablauf:

Zuerst wurde das Medium vorsichtig aus der Zellkulturflasche abgesaugt. Danach wurde die Flasche behutsam mit 10 ml PBS gespült. Dazu wurde das PBS der Flasche langsam hinzugefügt und diese geschwenkt, sodass der gesamte Boden einmal mit PBS benetzt war. Anschließend wurde das PBS achtsam abgesaugt. Nun wurden entweder 2 ml Accutase in die kleinere T75 Zellkulturflasche oder 4 ml Accutase in die T175 Zellkulturflasche gegeben, um die adhärenen Zellen von dieser abzulösen. Anschließend wurde sie geschwenkt, um die Accutase über den gesamten Boden der Flasche zu verteilen und für 5 min in den Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) gestellt. Nachfolgend wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, ob sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst haben. Wenn dies der Fall war, wurden 5 ml Basismedium hinzugefügt. Die dadurch erhaltene Flüssigkeit wurde sodann in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen übergeführt und zentrifugiert (270 x g, 5 min, 22 °C). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, sodass nur noch ein Zellpellet am Boden des Röhrchens zurück blieb. Das Zellpellet wurde dann mit 1-5 ml MSCBM, je nach Pelletgröße oder Art des geplanten Versuches, resuspendiert. Danach wurden 50 µl der Suspension in einen Casy Cup gegeben, der zuvor mit 1000 µl

CASYton gefüllt wurde, um die Zellen vom Zellzählgerät Casy TTC zählen zu lassen. Jetzt konnten Versuche mit einer definierten Anzahl von Zellen angesetzt, eine bestimmte Menge an Zellen weggefroren (siehe Punkt 7.2.4), oder eine gewisse Anzahl an Zellen weiter kultiviert werden.

7.2.4 Einfrieren der hMSCs

Zu Beginn wurde die Einfrierhilfe Mr. Frosty vorbereitet, indem man sie mit 250 ml Isopropanol füllte und in den -20 °C kalten Gefrierschrank stellte. Danach wurden die Stammzellen, wie in Punkt 7.2.3 beschrieben, passagiert.

Nachdem die Zellen mit dem Zellzählgerät Casy TTC gezählt wurden, wurde die Zell-Medium-Suspension mit Medium verdünnt, sodass in 900 µl dieser entweder 500.000 oder 1.000.000 Zellen enthalten waren. Folgend wurde die gewünschte Anzahl an CryoTubes (Einfrierröhrchen) berechnet, in die sodann jeweils 100 µl DMSO pipettiert wurden. Anschließend wurde der Mr. Frosty aus dem Gefrierschrank genommen. Dann wurden 900 µl der anfangs vorbereiteten Zell-Medium-Suspension in eines der zuvor bereitgestellten Einfrierröhrchen überführt, worauf dieses sorgfältig verschlossen wurde. Danach wurde das Röhrchen auf den Kopf und wieder zurück gedreht und zügig in den Mr. Frosty gestellt. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis alle vorbereiteten CryoTubes gefüllt (90 % Zell-Medium-Suspension, 10 % DMSO) im Mr. Frosty standen. Darauffolgend wurde der Mr. Frosty rasch in einen -80 °C kalten Gefrierschrank gestellt. Nach 24-96 Stunden wurden die Einfrierröhrchen schließlich in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank transferiert.

7.2.5 Zellen auftauen

Zuerst wurde pro Einfrierröhrchen, das aufgetaut werden sollte, ein 50 ml Zentrifugenröhrchen vorbereitet, indem es mit 5 ml Medium gefüllt wurde. Auf Eis wurden die gewünschten Einfrierröhrchen / das gewünschte Einfrierröhrchen sodann aus dem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank ins Labor gebracht.

Dort wurde jedes CryoTube einzeln kurz im Wasserbad (37 °C) geschwenkt und die darin enthaltene Zellsuspension umgehend in eines der zuvor bereitgestellten Zentrifugenröhrchen überführt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis alle mitgenommenen Zellsuspensionen in die Zentrifugenröhrchen geleert waren. Danach

wurden diese zentrifugiert (270 x g, 5 min, 22 °C). Daraufhin wurde der Überstand abgesaugt, sodass nur noch die Zellpellets am Boden der Röhren zurück blieben. Nun wurden die Zellen mit 10 ml Medium resuspendiert und in eine kleine Zellkulturflasche übergeführt. Danach wurden sie bei 37 °C, 5 % CO₂ im Inkubator für ca. eine Woche kultiviert. Folgend konnten die Zellen für Versuche verwendet werden.

7.2.6 Durchführung der osteogenen Differenzierung der hMSCs

Als Kontrolle zu der 3D Zellkultivierung im Kollagengel wurden Zellen zweidimensional auf Standard-Zellkulturoberflächen in 48-Well Platten kultiviert, um das osteogene Differenzierungspotenzial der Zellen zu überprüfen.

Kultivierung im Basismedium und im osteogenen Differenzierungsmedium:

Um die Zellen osteogen zu differenzieren, mussten diese zunächst, wie in Punkt 7.2.3 beschrieben, passagiert werden. Danach wurde 1 ml MSCBM bzw. 1 ml osteogenes Medium in die gewünschten Wells der 48-Well Platte vorgelegt. Anschließend wurden 5000 Zellen (aus dem Zentrifugenröhrchen mit der Zellsuspension) in jedes vorbereitete Well pipettiert. Durch Schwenken wurden die Zellen sodann gleichmäßig im Well verteilt, was mit Hilfe des Durchlichtmikroskops überprüft wurde. Danach wurden die Zellen im Inkubator kultiviert und 2 Mal wöchentlich wurde ein Mediumwechsel (osteogenes Medium und als Kontrolle MSCBM) durchgeführt.

7.2.7 Kultivierung von hMSCs in einem 3-dimensionalen (3D) Kollagengel

Vorbereitung:

Um die Zellen in einem 3D Kollagengel (Collagen I, Rat tail) kultivieren zu können, mussten sie zuerst, wie in Punkt 7.2.3 beschrieben, passagiert werden. Nachdem die Zellen in der Zellsuspension gezählt wurden, wurde die Zusammensetzung des Gels mit folgenden Formeln berechnet (Abbildung 1):

$$V1 = \frac{c_x \cdot V_t}{c} \qquad V2 = V1 * 0,025 \qquad V3 = V_t - (V1 + V2)$$

V1..... Volumen an benötigtem Kollagengel
 V2..... Volumen an benötigtem 1N Natriumhydroxid (NaOH)
 V3..... Volumen an benötigter Zellsuspension
 V_t..... Gewünschte Gesamtvolumen
 c_x..... Gewünschte Kollagenkonzentration
 c..... Initiale Kollagenkonzentration

Abbildung 1: Berechnung der Zusammensetzung des Kollagengels ("Collagen I Rat Protein, Tail - Thermo Fisher Scientific," n.d.)

Bei allen Versuchen mit dem 3D Kollagengel wurde ein Gesamtvolumen (V_t) von 600 µl und eine benötigte Kollagenkonzentration (c_x) von 2 mg/ml angenommen. Das verwendete Gel hatte eine initiale Konzentration (c) von 3 mg/ml. Somit setzten sich die 600 µl des 3D Kollagengels inklusive Zellen aus 400 µl Gel, 190 µl Zellsuspension und 10 µl 1N NaOH zusammen. Des Weiteren wurde die Zellsuspension stets so konzentriert oder mit Medium verdünnt, dass in 190 µl Suspension 200.000 humane Stammzellen enthalten waren.

Durchführung:

400 µl des Kollagengels wurden jeweils in ein Well der 48-Well Platte pipettiert. Danach fügte man 190 µl der Zellsuspension hinzu und versuchte die Zellen durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gleichmäßig im Gel zu verteilen. Danach setzte man 10 µl 1N NaOH zu und verteilte dieses, wie zuvor die Zellen, gleichmäßig im 3D Gel. Ein Gel ohne Zellen wurde als Kontrolle angesetzt. Dazu mischte man 400 µl Gel mit 190 µl Medium und 10 µl 1N NaOH. Anschließend stellte man die 48-Well Platte für 40 min in den Inkubator (37 °C, 5 % CO₂), wodurch die Gele fest wurden. Danach pipettierte man vorsichtig 1 ml Medium auf jedes Gel, um die Zellen mit ausreichend Nährstoffen zu versorgen. Folgend stellte man die Well-Platte wieder in den Inkubator und führte 2 Mal wöchentlich einen Mediumwechsel durch.

7.2.8 Osteogene Differenzierung der hMSCs in einem 3D Kollagengel

Zunächst wurden die Zellen passagiert (Punkt 7.2.3) und das Zellpellet wurde nach der Zentrifugation im osteogenen Differenzierungsmedium resuspendiert. Danach führte man die Zellzählung mittels Casy TTC durch und setzte das 3D Gel mit 200.000 Zellen (siehe 7.2.7) und osteogenem Medium an.

7.2.9 Lebend/Tod-Färbung der Zellen in einer 48-Well Platte

Mit der Lebend/Tod-Färbung wurden im Fluoreszenzmikroskop bei einer eingestellten Wellenlänge von 510 nm lebendige (grün) von toten (rot) Zellen unterschieden.

Aufbau des Versuches:

Zu Beginn wurden die Zellen jedes Donors / jeder Donorin wie in Punkt 7.2.3 beschrieben, passagiert. Danach wurden 3 48-Well Platten genau gleich angesetzt:

Pro DonorIn wurde 1 Well der Platte mit 200.000 Zellen im 3D Kollagengel (Punkt 7.2.7) und 1 Well mit 5.000 Zellen als 2D Kontrolle (7.2.6) gefüllt. Danach wurde in jeder 48-Well Platte ein 3D Kollagengel ohne Zellen als Kontrolle (Punkt 7.2.7) angesetzt.

Anschließend wurden die Platten in den Wärmeschrank (37 °C, 5 % CO₂) gestellt und 2 Mal wöchentlich ein Mediumwechsel durchgeführt.

Im weiteren Verlauf wurde eine Platte am nächsten Tag (Tag 1), eine nach 7 Tagen (Tag 7) und eine nach 2 Wochen (Tag 14) mittels Lebend/Tod-Färbung evaluiert.

Gemeinsame Vorbereitung:

Für jedes anzufärbende Well benötigte man 1 ml der Lebend/Tod-Färbelösung. Da diese nicht haltbar und sehr lichtempfindlich ist, stellte man immer nur so viel Lösung her, wie man später für den Versuch benötigte. Die Färbelösung besteht aus PBS, Ethidium und Calcein, welche im Verhältnis 2000 : 4 : 1 gemischt wurden. Diese wurden sodann in einem möglichst abgedunkelten Raum in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und geschüttelt, um eine gute Vermischung der einzelnen Komponenten zu gewährleisten. Anschließend wurde das Röhrchen in Alufolie gewickelt, um es vor Lichteinflüssen zu schützen. Danach wurde die zu untersuchende 48-Well Platte aus dem Wärmeschrank geholt und wie nachfolgend beschrieben angefärbt.

Punkt 1) und 2) wurden gleichzeitig durchgeführt und sind nur der besseren Verständlichkeit halber getrennt beschrieben.

1) Lebend/Tod-Färbung von adhärenenten Zellen:

Als erstes wurde das Medium aus jedem Well vorsichtig abgesaugt. Danach wurden die Zellen behutsam 2 Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Raum abgedunkelt

und 1 ml der Färbelösung in jedes mit Zellen besiedelte Well pipettiert. Daraufgehend wurde die 48-Well Platte für 20 Minuten in den Wärmeschrank (37 °C, 5 % CO₂) gestellt. Danach wurde die Färbelösung wieder vorsichtig abgesaugt und die Zellen 3 Mal mit PBS gewaschen. Nun wurde 1 ml PBS in die gewünschten Wells pipettiert und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops wurden Bilder der gefärbten Zellen aufgenommen.

2) Lebend/Tod-Färbung von Zellen im 3D Kollagengel:

Wie oben beschrieben, wurde auch hier zunächst das Medium aus den jeweiligen Wells abgesaugt, die Gele 2 Mal mit PBS gewaschen und der Raum abgedunkelt. Da die Färbelösung (1 ml/Gel) bei den ersten Versuchen schlecht in das Gel hineindiffundierte, wurde diese schließlich ins Gel gespritzt. Dazu wurde mit der Pipettenspitze in das Gel hineingestochen und beim Herausziehen der Spitze wurde die Färbelösung langsam in das Gel injiziert. Dabei wurde jedes Gel mit einer eigenen Pipettenspitze gefärbt, um Verfälschungen zu vermeiden. Anschließend wurde die 48-Well Platte für 20 Minuten in den Wärmeschrank (37 °C, 5 % CO₂) gestellt. Daraufgehend wurde die Färbelösung wieder herausgesaugt und die Gele 3 Mal mit PBS gewaschen. Auch hierzu musste vorsichtig in das Gel hineingestochen werden. Nachstehend wurden ungefähr 3 Tropfen PBS auf jedes Gel getropft, um sie besser unter dem Fluoreszenzmikroskop untersuchen zu können.

7.2.10 Alizarinrot-Färbung der Zellen in einer 48-Well Platte

Mit Hilfe der Alizarinrot-Färbung kann Calcium sehr sensibel nachgewiesen und der Erfolg der osteogenen Differenzierung beurteilt werden.

Aufbau des Versuches:

Zu Beginn wurden die Zellen der DonorInnen, wie in Punkt 7.2.3 beschrieben, passagiert. Danach wurde die Flüssigkeits-Zellsuspension, die man nach dem Ablösevorgang erhielt, in 2 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Diese wurden anschließend zentrifugiert (270 x g, 5 min, 22 °C). Daraufgehend wurde 1 Zellpellet mit dem speziellen Basismedium (MSCBM) und ein Zellpellet mit dem osteogenen Differenzierungsmedium (hMSC) resuspendiert. Nun wurden die Zellen, wie in Punkt 7.2.3 erläutert, gezählt. Danach wurden 2 48-Well Platten (Tag 7, Tag 14) genau gleich angesetzt:

Pro DonorIn wurden genau 4 Wells benötigt. Dabei wurde ein Well mit 200.000 Zellen im 3D Gel mit osteogenem Differenzierungsmedium, eines mit 200.000 Zellen im 3D Gel mit MSCBM, eines mit 20.000 Zellen im osteogenen Differenzierungsmedium (2D Kontrolle) und das letzte mit 20.000 Zellen im MSCBM (2D Kontrolle) gefüllt. Die 3D Gele wurden, wie in Punkt 7.2.8 bzw. 7.2.7 beschrieben, die 2D Kontrollen, wie in Punkt 7.2.6 erklärt, hergestellt. Anschließend wurden die Platten in den Wärmeschrank (37 °C, 5 % CO₂) gestellt und 2 Mal wöchentlich ein Mediumwechsel durchgeführt. Die erste Platte wurde dann nach 1 Woche (Tag 7), die 2. Platte nach 2 Wochen (Tag 14) mittels Alizarinrot S-Lösung gefärbt.

Vorbereitung der Färbung:

Zu Beginn wurde 1 ml Alizarinrot S pro anzufärbendem Well in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Anschließend wurde ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 50 %igem Ethanol befüllt. Dazu wurde 99,8 %iger vergällter Ethanol mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:1 gemischt.

Durchführung der Färbung:

Zu Beginn wurde das Medium vorsichtig aus den einzelnen Wells abgesaugt. Dabei verwendete man für jedes Well eine eigene Absaugpipette, um Kontaminationen mit Knochenzellen zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 50 %igem Ethanol fixiert, indem man 1 ml des Ethanols in jedes mit Zellen oder Gel gefüllte Well pipettierte. Dann wurde die 48-Well Platte 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nachstehend wurde der Ethanol vorsichtig abgesaugt und die Zellen einmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Dabei musste stets mit Bedacht gearbeitet werden, da sich die Zellen leicht ablösen lassen. Anschließend wurde 1 ml Alizarinrot S-Lösung in jedes anzufärbende Well pipettiert und die Platte 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes wurde die Färbelösung wieder abgesaugt und die Zellen 3 Mal gründlich mit großer Vorsicht mit destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurden einige Tropfen destilliertes Wasser auf die Gele und 1 ml destilliertes Wasser auf die Zellen getropft, um sie anschließend im Lichtmikroskop untersuchen zu können.

7.2.11 Aufbau von 3D Gelen inklusive Implantaten (Mg10Gd, Ti)

Pro 48-Well Platte wurden pro DonorIn 3 3D Gele in osteogenem Medium, wie in Punkt 7.2.8 beschrieben, und bei einem/r DonorIn wurden zusätzlich 3 3D Gele in MSCBM (3D Kontrollgele), wie in Punkt 7.2.7 erläutert, hergestellt. Anschließend wurden die Implantat-Pins (Ø: 1 mm, Länge: 12 mm) mit Hilfe von 99,8 %igem Ethanol sterilisiert und anschließend mit MSCBM unter sterilen Bedingungen abgewaschen. Danach wurde jeweils ein Mg10Gd-Implantat-Pin und ein Ti-Implantat-Pin pro DonorIn in ein 3D Gel und 3D Kontrollgel eingebracht. Ein 3D Gel und 3D Kontrollgel pro DonorIn blieb zur Kontrolle implantatfrei. Die 48-Well Platten (Tag 1, Tag 13) wurden dann in den Wärmeschrank gestellt und zweimal wöchentlich wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

7.2.12 Untersuchung der Implantate mittels μ CT-Scans

Die 3D Gele mit Implantaten wurden am nächsten Tag (Tag 1), sowie 13 Tage (Tag 13) nach Herstellung mittels eines Siemens Inveon Micro CT Gerätes gescannt (Spannung: 80 kV, Stromstärke: 500 μ A, transaxiales Sichtfeld: 80,07 mm, axiales Sichtfeld: 53,38 mm). Anschließend wurden die Scans mit dem Computerprogramm Mimics Medical 19.0 ausgewertet. Dabei wurde speziell die Degradation der Mg-Implantate untersucht.

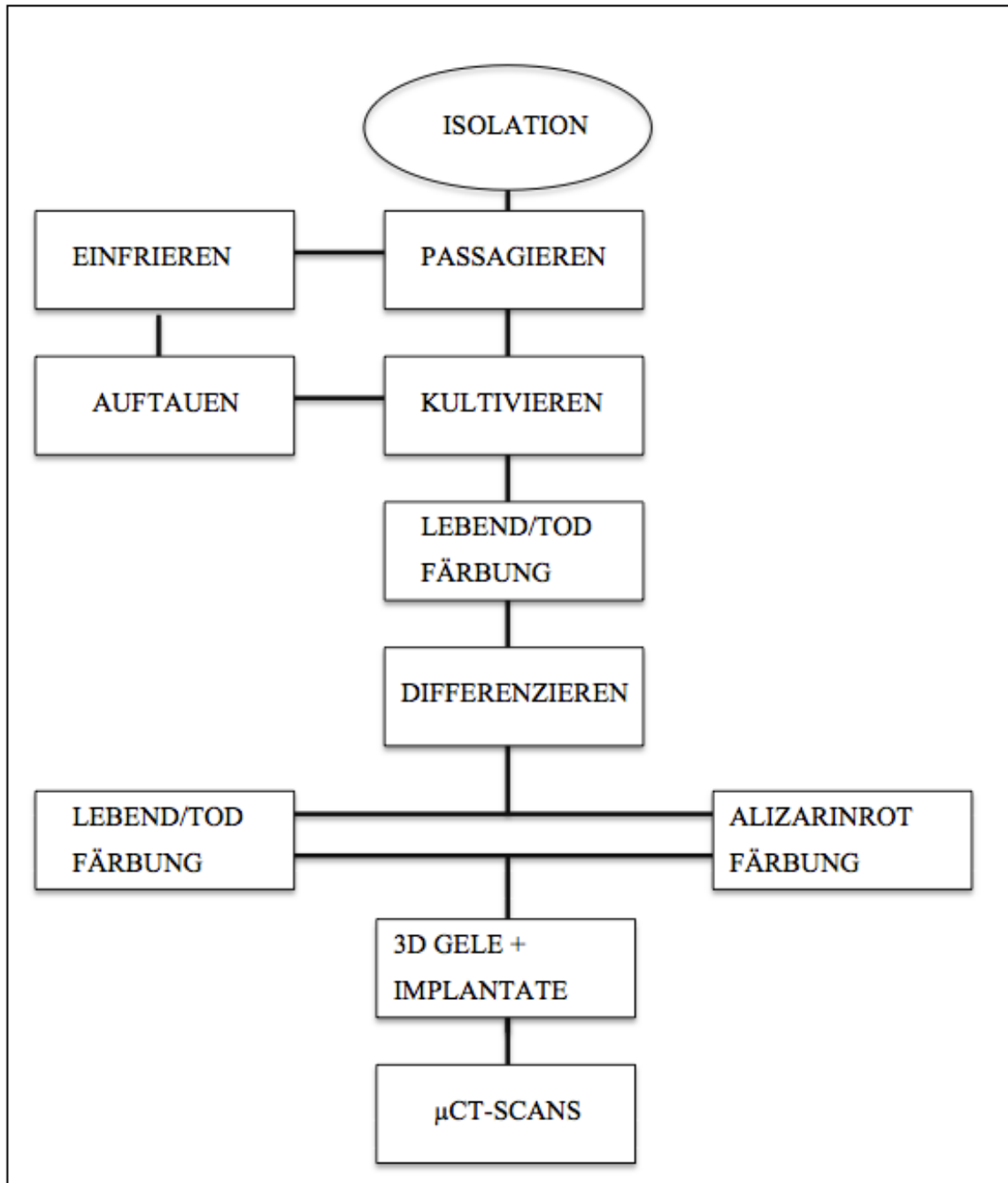


Abbildung 2: Arbeitsschritte

8 Ergebnisse – Resultate

8.1 Evaluierung des Isolationsvorganges von hMSCs aus humanen Femurköpfen mittels Lichtmikroskopie

Nachdem die hMSCs, wie in Punkt 7.2.2 beschrieben, aus den humanen Femurköpfen isoliert und kultiviert worden waren, wurden sie beim ersten Mediumwechsel (2 Tage nach Isolation) lichtmikroskopisch beurteilt, um die erfolgreiche Isolation zu bestätigen. Dabei sah man in den ersten Tagen vereinzelt adhärente potenzielle Stammzellen bei allen DonorInnen. Die adhärennten Zellen (spindelförmig) sind dabei von den nicht adhärennten Zellen bzw. Blutkörperchen (kreisrund) zu unterscheiden (siehe Abb.: 3 + 4).



Abbildung 3: Die lichtmikroskopische Aufnahme 2 Tage nach Zellisolation zeigt adhärennte potenzielle Stammzellen (grün) und nicht adhärennte Zellen / Blutkörperchen (rot); DonorIn 3 – Passage 0

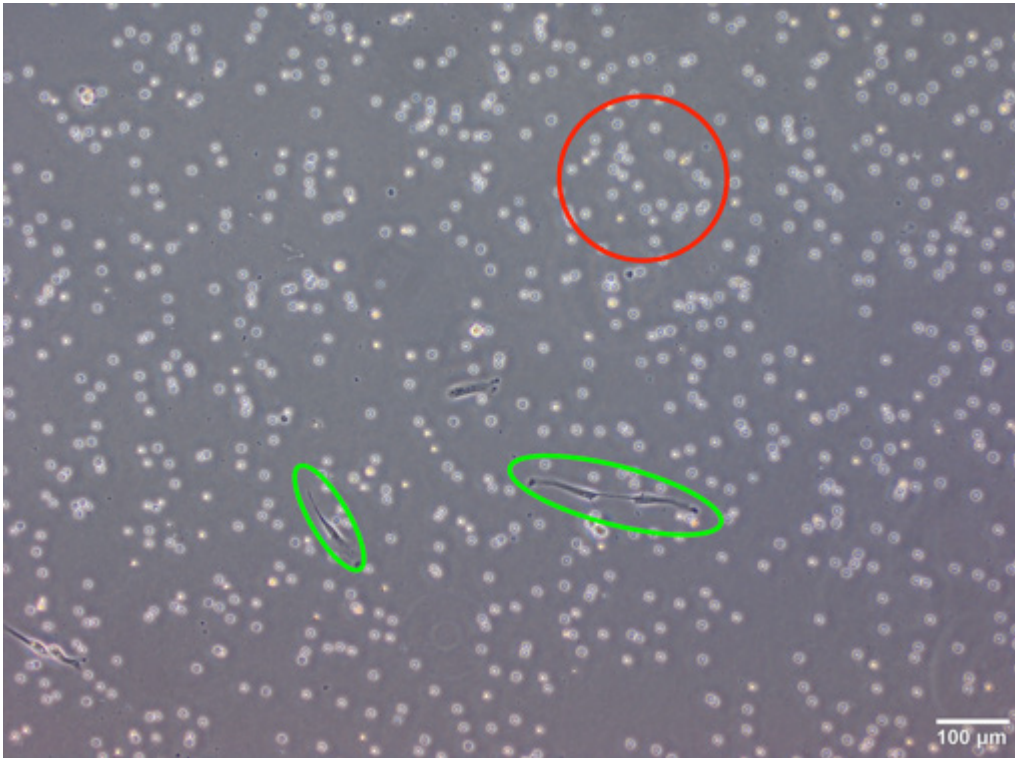


Abbildung 4: Die lichtmikroskopische Aufnahme 2 Tage nach Zellisolation zeigt adhärenente Zellen (grün) und nicht adhärenente Zellen / Blutkörperchen (rot); DonorIn 1 – Passage 0

Nach einer Woche Zellkultur konnte unter dem Lichtmikroskop eine weitaus größere Anzahl adhärenenter Zellen in den Kulturflaschen gesehen werden (siehe Abb.: 5 + 6).

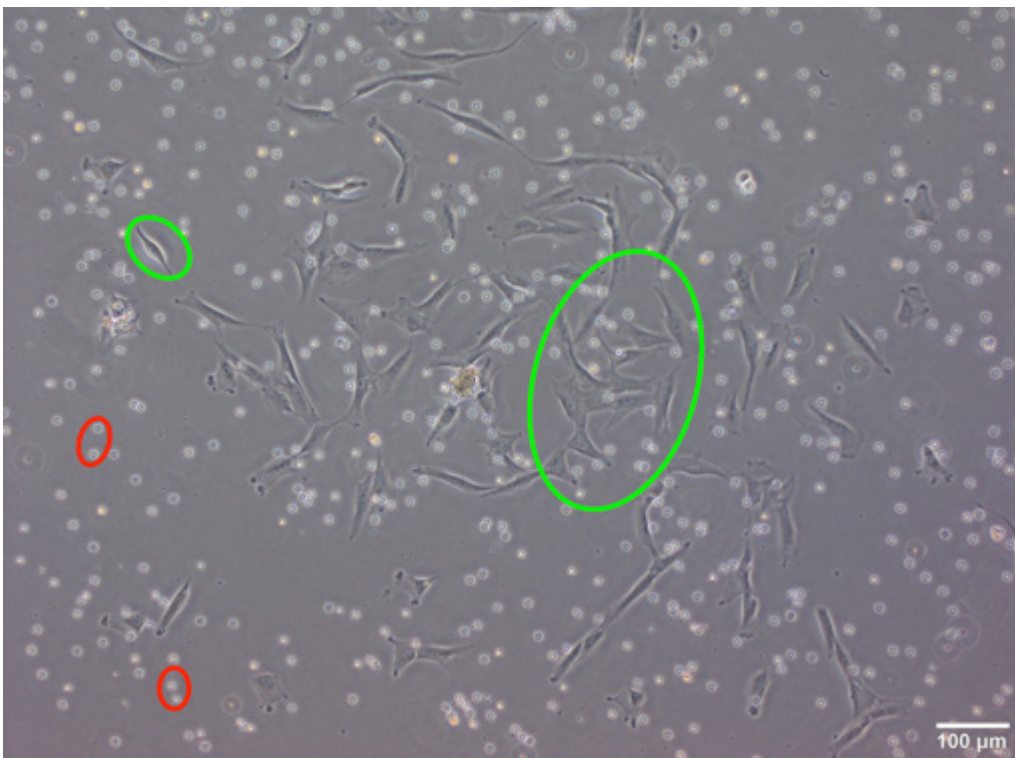


Abbildung 5: 7 Tage nach Zellisolation zeigt die lichtmikroskopische Aufnahme eine Vermehrung der adhärenenten Zellen (grün). Auch Blutkörperchen (rot) sind zu sehen; DonorIn 1 – Passage 0

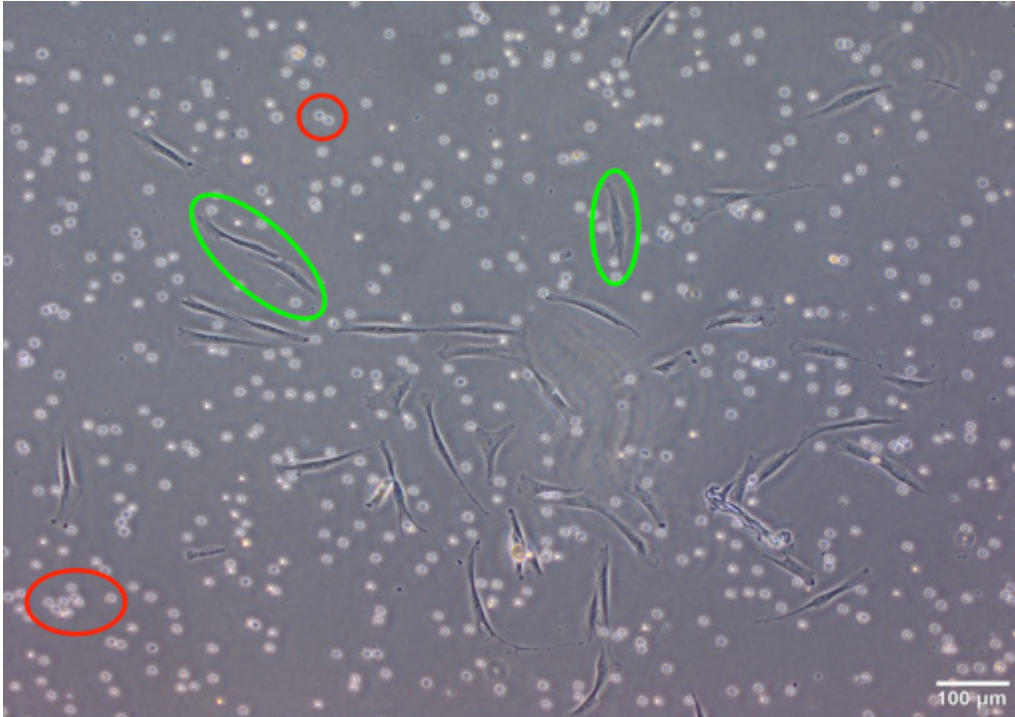


Abbildung 6: In dieser lichtmikroskopischen Aufnahme 7 Tage nach Zellisolation sind vermehrt adhärenente Zellen (grün), sowie Blutkörperchen (rot) zu sehen; DonorIn 2 – Passage 0

Nach 2 Wochen waren ca. 80-90 % der Oberfläche der Zellkulturflaschen mit adhärenenten potenziellen hMSCs besiedelt (siehe Abb.: 7 + 8). Die Zellen bildeten durch vermehrten Zellkontakt sternförmige Zellstrukturen (siehe Abb.: 9 + 10).

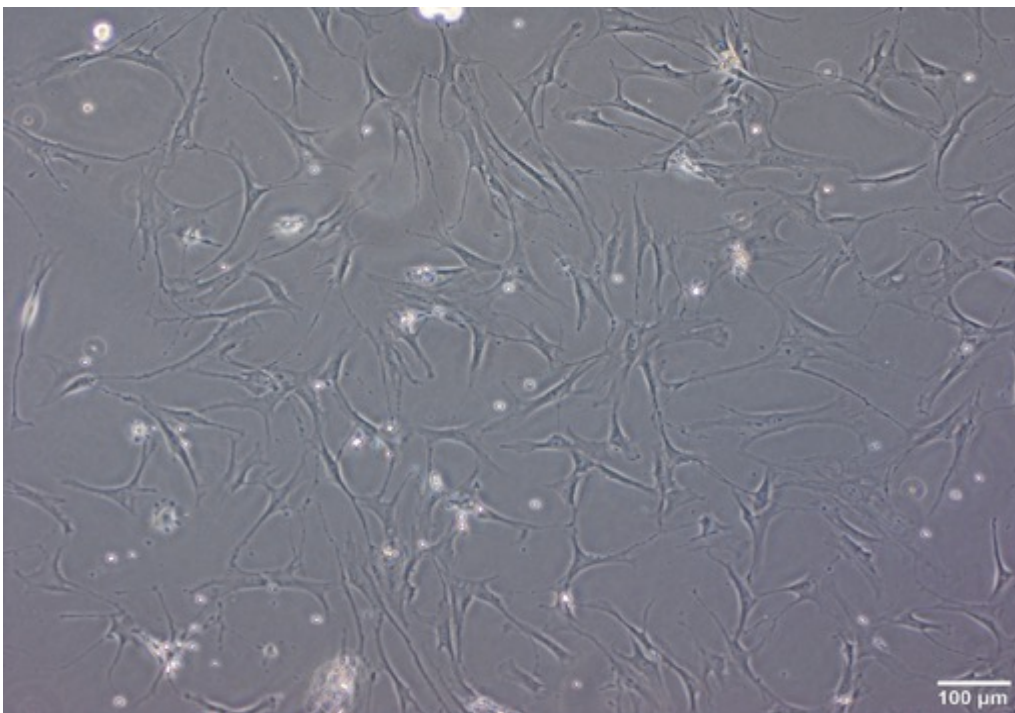


Abbildung 7: 14 Tage nach Zellisolation zeigt diese lichtmikroskopische Aufnahme großflächig adhärenente potenzielle Stammzellen; DonorIn 2 – Passage 0

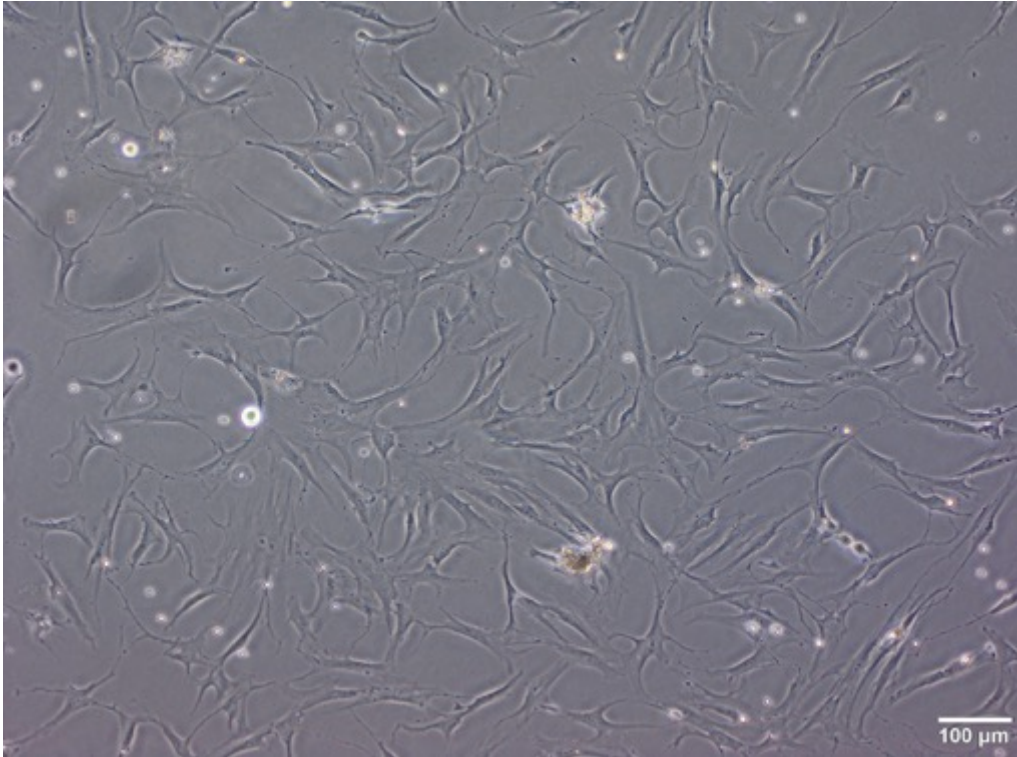


Abbildung 8: Diese lichtmikroskopische Aufnahme 14 Tage nach Zellisolation zeigt großflächig adhärenente Zellen; DonorIn 1 – Passage 0

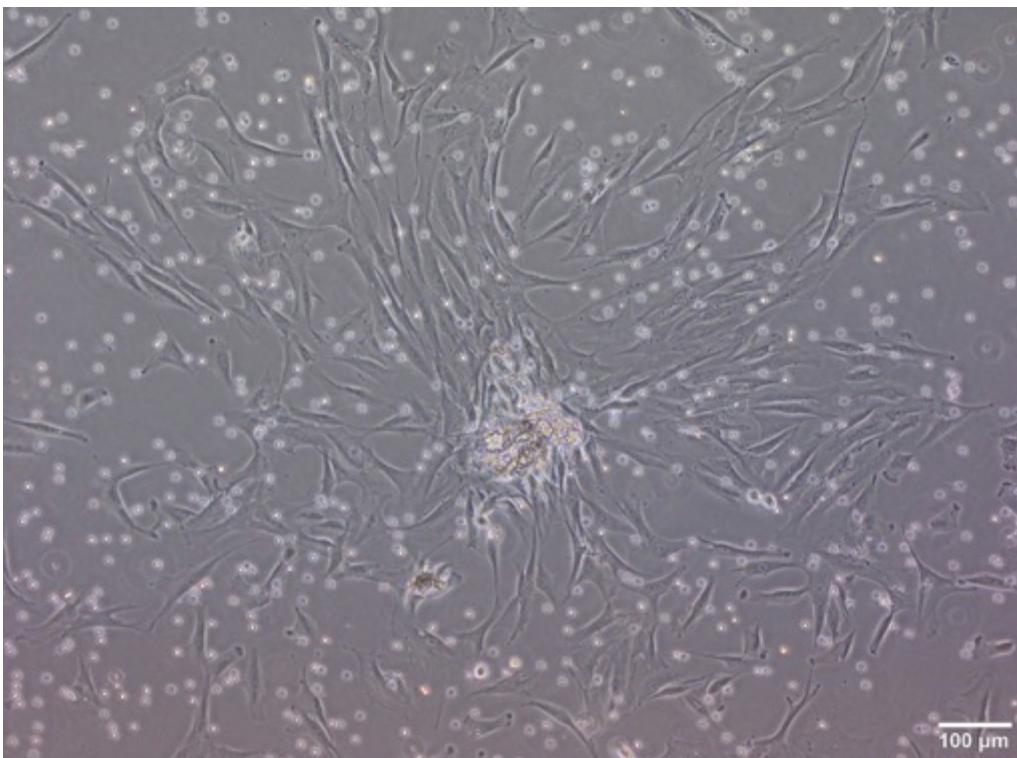


Abbildung 9: In dieser lichtmikroskopischen Aufnahme 14 Tage nach Zellisolation zeigen die adhärenente Zellen eine sternförmige Zellstruktur mit zentralem Kern; DonorIn 1 – Passage 0

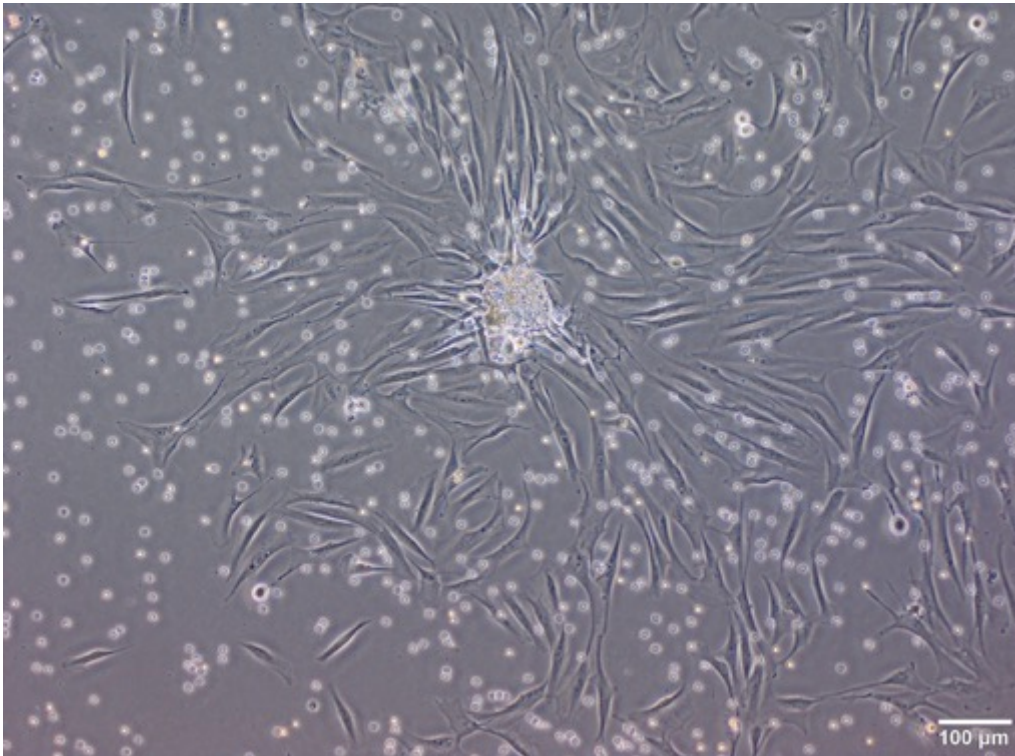


Abbildung 10: Diese lichtmikroskopische Aufnahme 14 Tage nach Zellisolation zeigt adhärente Zellen in einer sternförmigen Zellstruktur mit zentralem Kern; DonorIn 2 – Passage 0

Nach 2 Wochen Kultivierungszeit wurden pro DonorIn 2 Millionen potenzielle hMSCs eingefroren (7.2.4) und somit für die weiteren Versuche verwendbar gemacht. Die erfolgreiche Isolierung der Zellen für diese Studie war dabei unabhängig von Alter und Geschlecht der PatientInnen.

Lichtmikroskopisch konnte gezeigt werden, dass sich mit dem verwendeten Isolationsprotokoll (7.2.2) ausreichend Stammzellen (in Punkt 8.3 bestätigt) aus den bereitgestellten humanen Femurköpfen isolieren ließen. Um die Überlebensfähigkeit der neu gewonnenen hMSCs zu überprüfen, wurde im nächsten Schritt eine Lebend/Tod-Färbung dieser durchgeführt.

8.2 Evaluierung der Zellviabilität mittels Lebend/Tod-Färbung

Um die Zellviabilität der hMSCs zu beurteilen, wurden die Versuche zur Lebend/Tod-Färbung der Zellen wie in Punkt 7.2.9 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden stets hMSCs in einer 2D Kontrollgruppe und hMSCs in einem 3D Gel untersucht.

Am 1. und 7. Tag der Kultur ließen sich die Zellen in den 3D Gelen nicht anfärben, da die Färbelösung nicht ausreichend durch das Gel diffundierte (siehe Abb.: 12 + 14). Die 2D Kontrollzellen zeigten jedoch zu beiden Zeitpunkten positive Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde die Färbemethode, wie in Punkt 7.2.9 beschrieben, angepasst. Am Tag 14 ließen sich sowohl die 2D Kontrollzellen, als auch die hMSCs in den 3D Gelen mit der Färbelösung anfärben.

Die Stammzellen in der 2D Kontrollgruppe zeigten an allen 3 Untersuchungstagen (Tag 1, 7, 14) eine Überlebensrate von 99 %. Weiter konnte man in dieser Gruppe auch eine deutliche Vermehrung der lebenden Stammzellen beobachten (siehe Abb.: 11, 13, 15, 16). Am Tag 7 fiel auch schon eine beginnende Gruppierung der Stammzellen auf (siehe Abb.: 13), die bis zum Tag 14 weiter zunahm (siehe Abb.: 15 + 16).

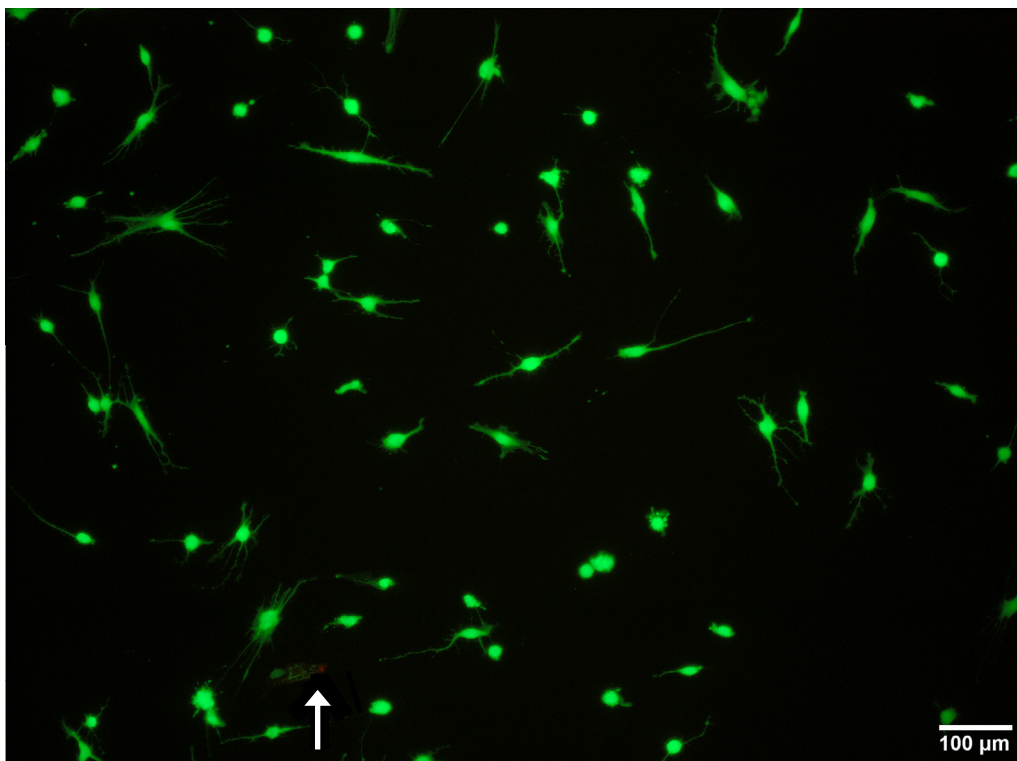


Abbildung 11: Diese fluoreszenzmikroskopische Aufnahme an Tag 1 in 2D Kontrollzellkultur zeigt lebende hMSCs (grün) und tote Zellen (rot, Pfeil) nach Lebend/Tod-Färbung; DonorIn 1 – Passage 1



Abbildung 12: Diese fluoreszenzmikroskopische Aufnahme an Tag 1 im 3D Gel zeigt eine lebende hMSC (grün) nach Lebend/Tod-Färbung; DonorIn 1 – Passage 1

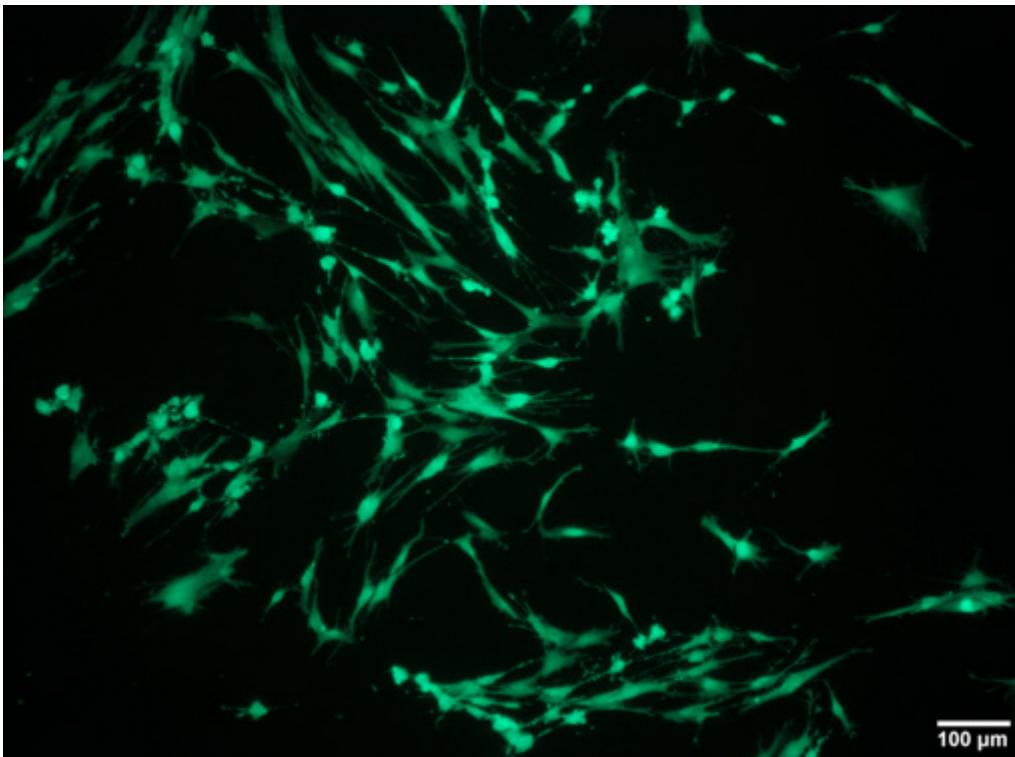


Abbildung 13: Diese fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach 7 Tagen 2D Kontrollzellkultur zeigt eine Zunahme lebender hMSCs (grün) nach Lebend/Tod-Färbung; DonorIn 2 – Passage 1



Abbildung 14: Diese fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach 7 Tagen Zellkultur im 3D Modell zeigt eine lebende hMSC (grün) nach Lebend/Tod-Färbung; DonorIn 2 – Passage 1

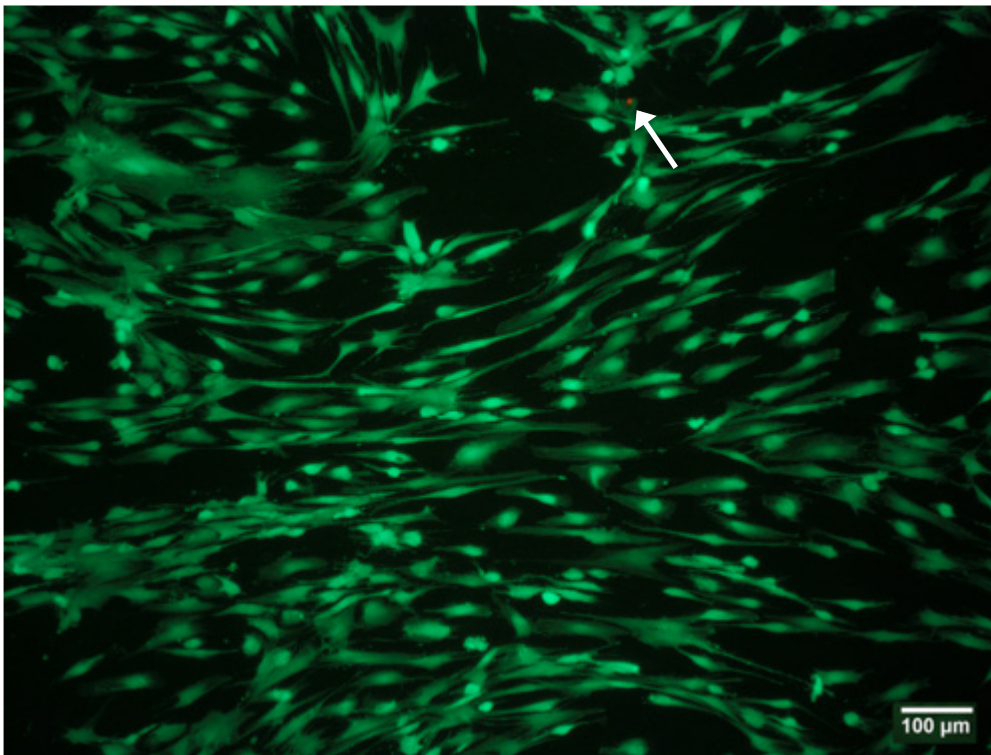


Abbildung 15: Diese fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach 14 Tagen 2D Kontrollzellkultur zeigt eine weitere Vermehrung lebender hMSCs (grün), sowie eine tote hMSC (rot - Pfeil) nach Lebend/Tod-Färbung; DonorIn 2 – Passage 1

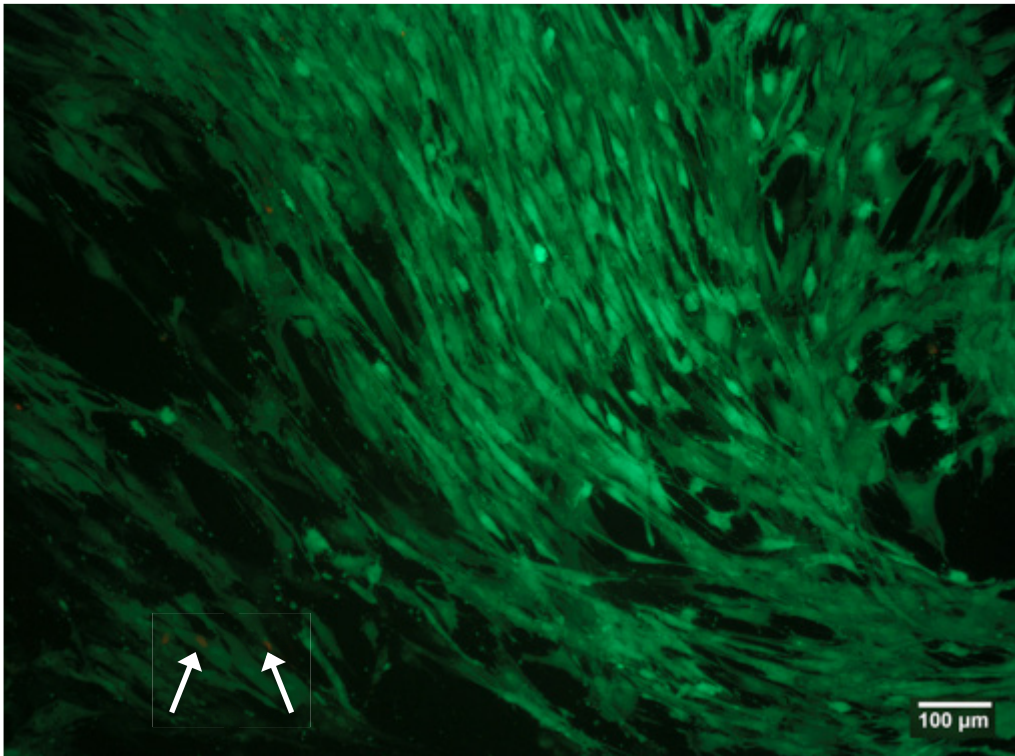


Abbildung 16: Diese fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach 14 Tagen 2D Kontrollzellkultur zeigt eine weitere Vermehrung lebender hMSCs (grün), sowie einzelne tote hMSCs (rot - Pfeile) nach Lebend/Tod-Färbung; DonorIn 1 – Passage 1

Am Tag 14 wurden die hMSCs in den 3D Gelen angefärbt. Auch diese zeigten eine 99 %ige Überlebensrate in allen Schichten des 3D Gels (siehe Abb.: 17-19).

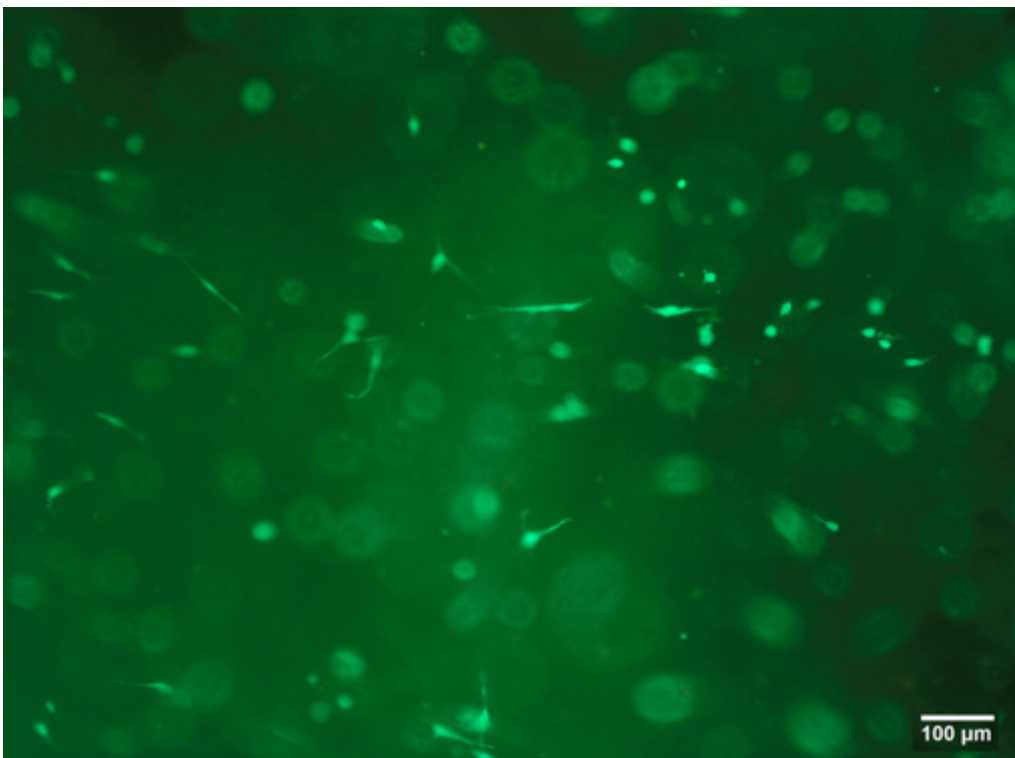


Abbildung 17: Diese fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach 14 Tagen Zellkultur im 3D Gel zeigt lebende hMSCs (grün) nach Lebend/Tod-Färbung; DonorIn 1 – Passage 1

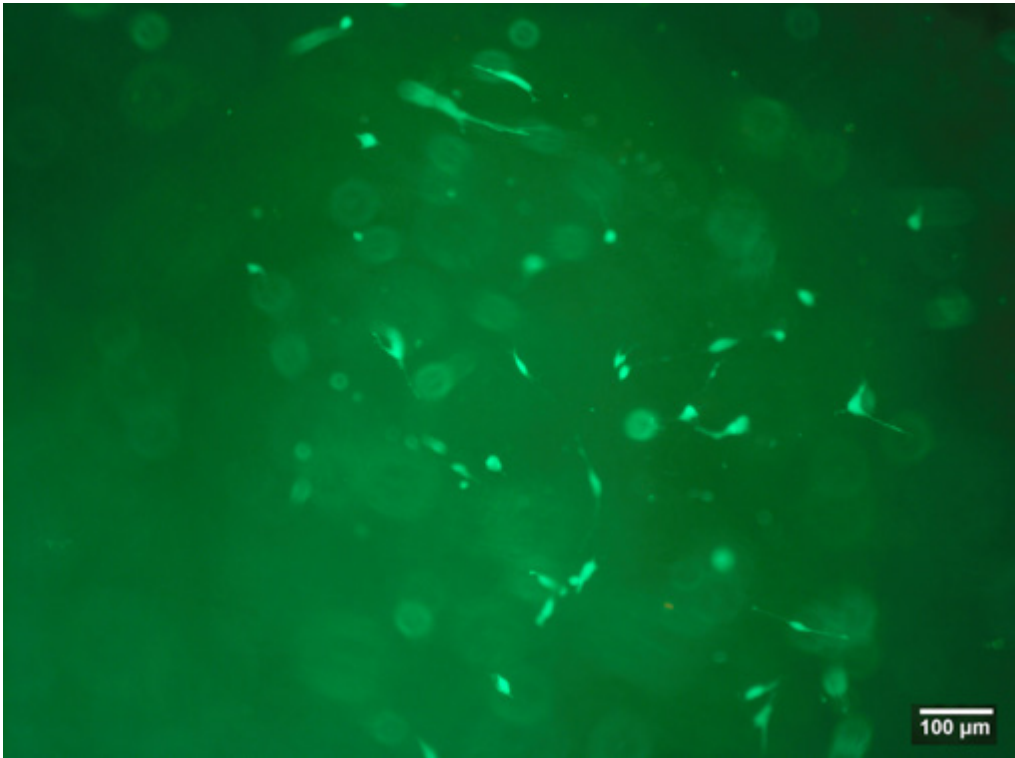


Abbildung 18: Diese fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach 14 Tagen Zellkultur im 3D Gel zeigt lebende hMSCs (grün), sowie tote hMSCs (rot) nach Lebend/Tod-Färbung; DonorIn 1 – Passage 1

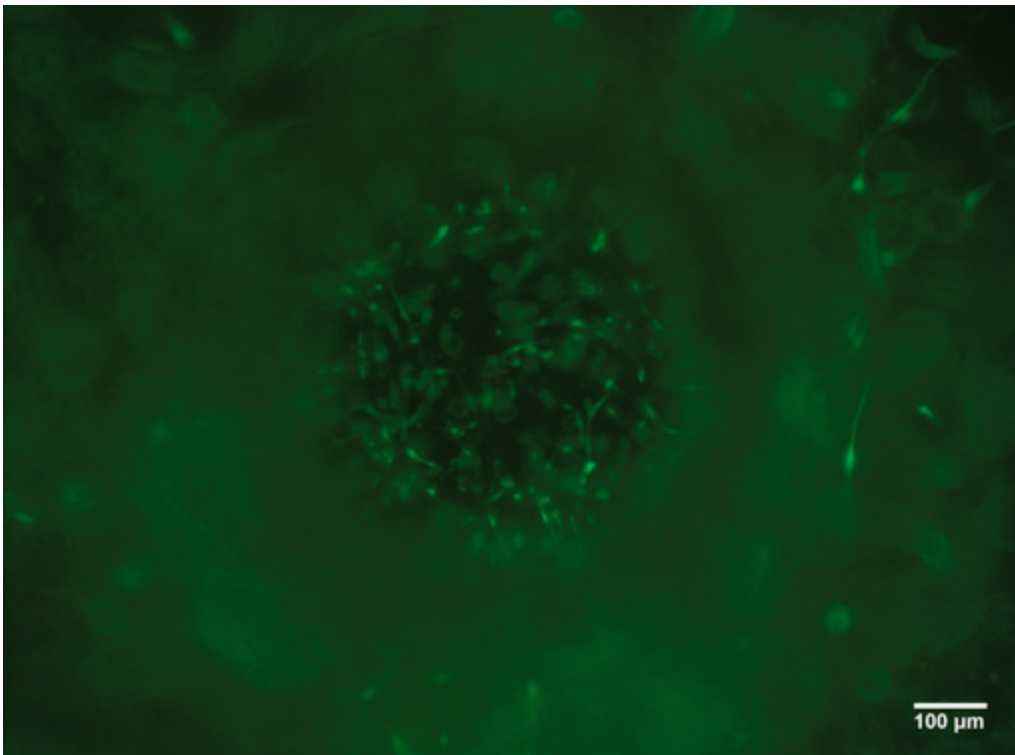


Abbildung 19: Diese fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach 14 Tagen Zellkultur im 3D Gel zeigt lebende hMSCs (grün) nach Lebend/Tod-Färbung; DonorIn 2 – Passage 1

Mit den vorliegenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass ungefähr 99 % der Stammzellen 2 Wochen lang sowohl in einer 2D Zellkultur als auch im 3D Kollagengel unabhängig von Alter und Geschlecht der FemurkopfspenderInnen überleben. Daher wurde im nächsten Experiment überprüft, ob sich die Zellen osteogen differenzieren lassen.

8.3 Evaluierung der osteogenen Differenzierung mittels Alizarinrot-Färbung

Mit Hilfe der Alizarinrot-Färbung kann Calcium sehr sensibel nachgewiesen werden, wodurch man eine erfolgreiche osteogene Differenzierung der hMSCs bestätigen kann. Die Alizarinrot-Färbung wurde wie in Punkt 7.2.10 beschrieben durchgeführt. Es wurden jeweils 3D Gele mit Zellen im osteogenen Differenzierungsmedium und zur Kontrolle im MSCBM (Proliferationsmedium) angesetzt. Zur weiteren Kontrolle wurden zudem 2D Zellkulturen mit osteogenem Differenzierungsmedium bzw. MSCBM kultiviert. Die Auswertung der lichtmikroskopischen Bilder zeigte, dass sich die Zellen im osteogenen Differenzierungsmedium im Gegensatz zu den Zellen im MSCBM zu Osteoblasten und Vorläuferzellen differenzierten und deshalb deutlich rot anfärbten. Vor allem in der 2D Kontrolle konnte dies auch makroskopisch gezeigt werden (siehe Abb.: 20 + 21).

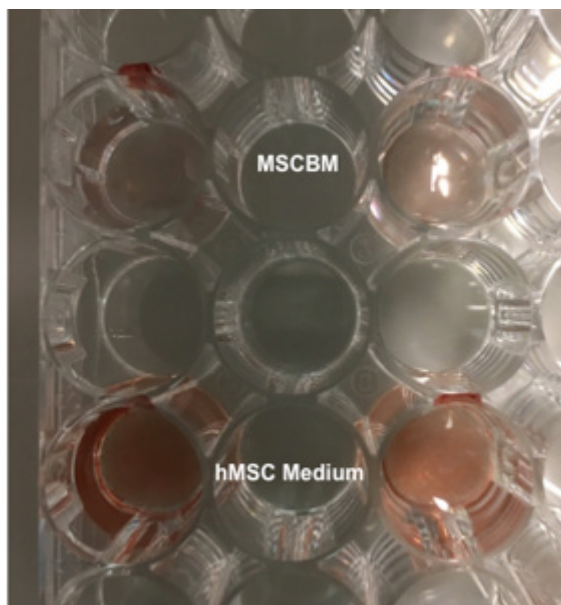


Abbildung 20: Makroskopischer Nachweis der osteogenen Differenzierung (untere Reihe) mittels Alizarinrotfärbung an Tag 14; DonorInnen 1 und 2

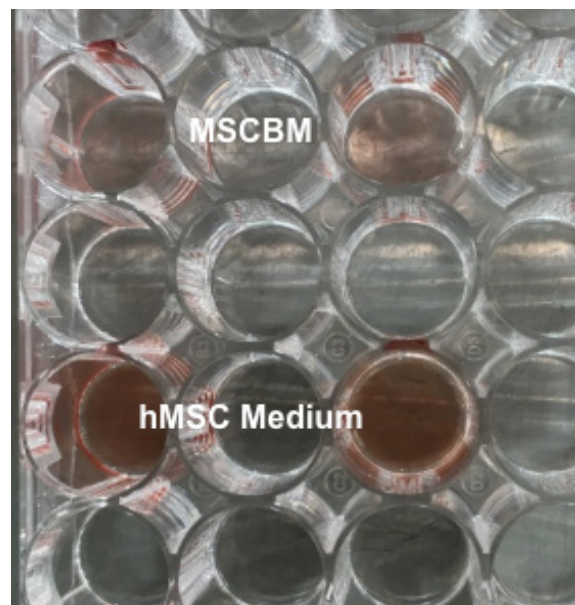


Abbildung 21: Makroskopischer Nachweis der osteogenen Differenzierung (untere Reihe) mittels Alizarinrotfärbung an Tag 14; DonorInnen 3 und 6

Wie die folgenden Abbildungen zeigen, besitzen die isolierten humanen mesenchymalen Stammzellen das Potenzial sich unter *ex vivo* Bedingungen zu Osteoblasten zu differenzieren (färben sich rot an, da die extrazelluläre Matrix Calcium enthält). Die Bilder zeigen außerdem sowohl in der 2D Zellkultur, als auch in den 3D Gelen, dass das Ausmaß der Differenzierung und damit Kalzifizierung von Tag 7 bis 14 deutlich zunimmt (siehe Abb.: 22, 26 und 24, 28).

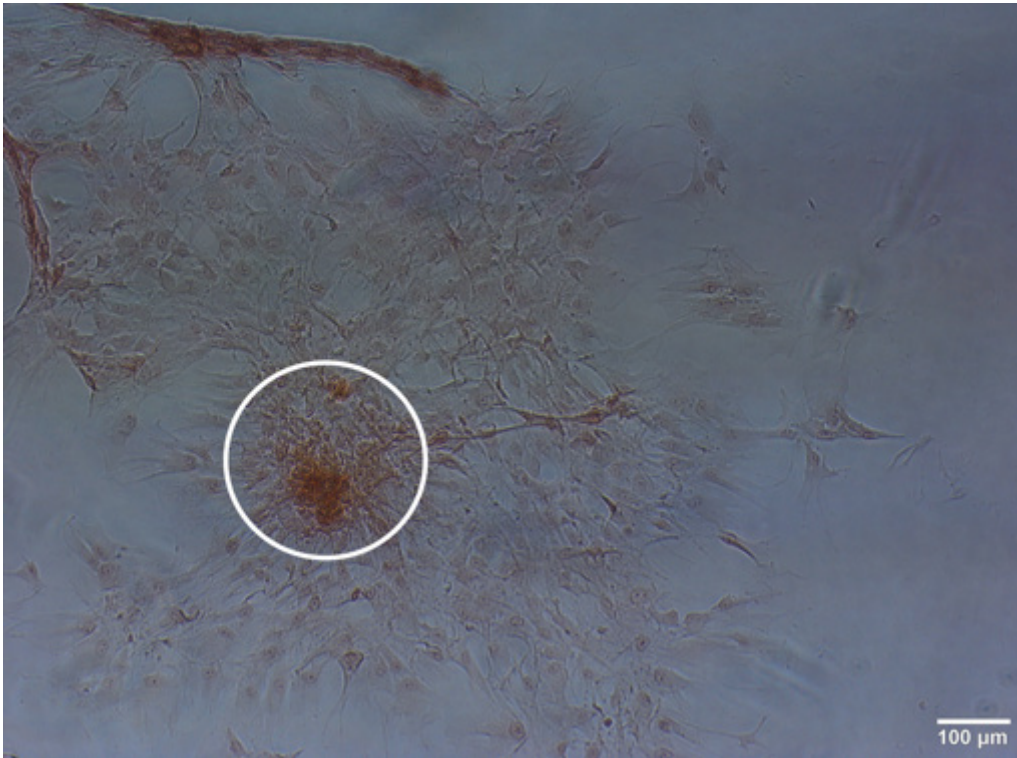


Abbildung 22: Lichtmikroskopische Bestätigung der osteogenen Differenzierung mittels Alizarinrotfärbung (Kreis) nach 7 Tagen 2D Zellkultur; DonorIn 3 – Passage 2

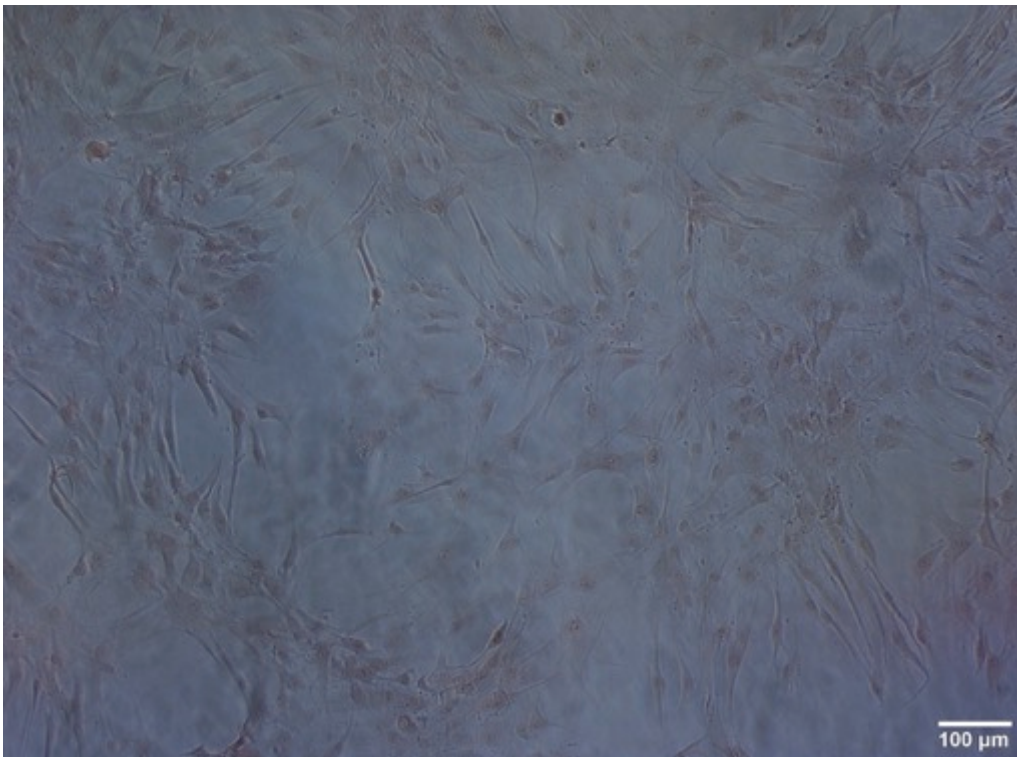


Abbildung 23: Lichtmikroskopische Aufnahme der Kontroll-Alizarinrotfärbung in MSCBM (keine Differenzierung) nach 7 Tagen 2D Zellkultur; DonorIn 3 – Passage 2

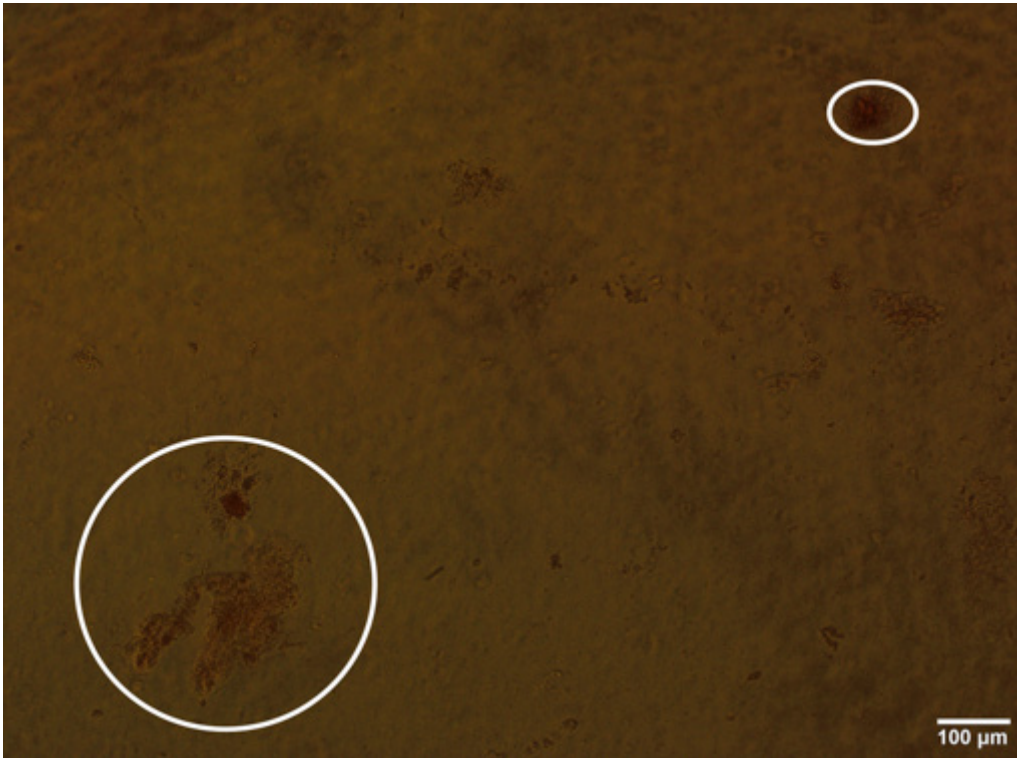


Abbildung 24: Lichtmikroskopische Bestätigung der osteogenen Differenzierung der hMSCs (Kreis) mittels Alizarinrotfärbung nach 7 Tagen Zellkultur im 3D Gel; DonorIn 6 – Passage 2

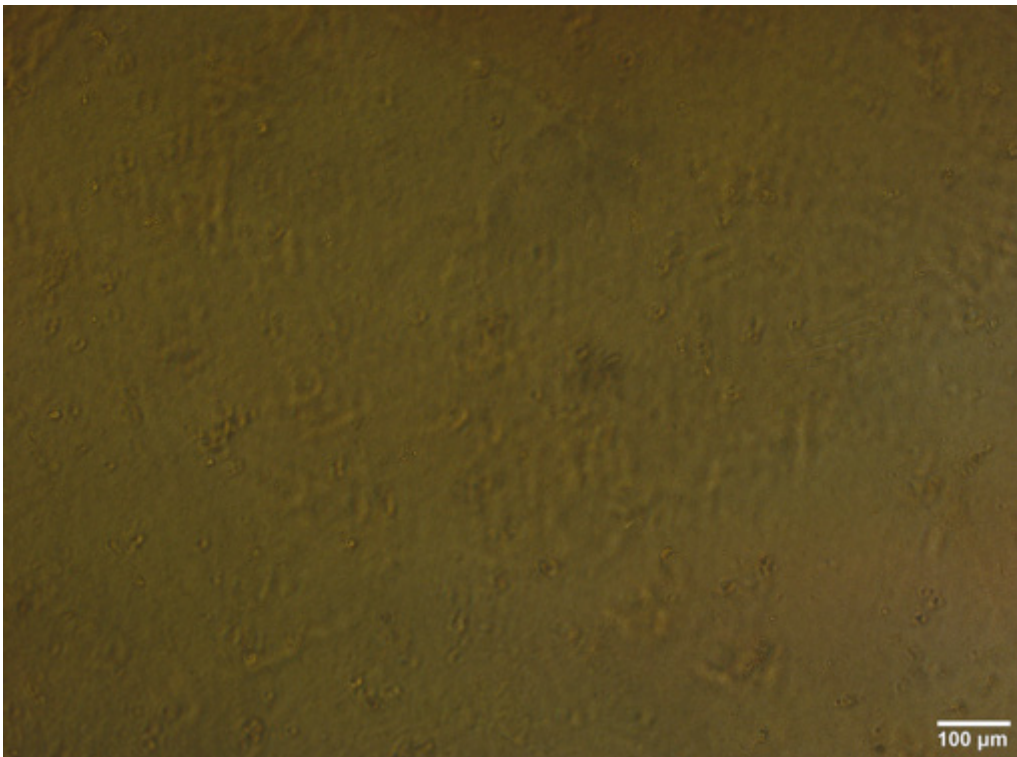


Abbildung 25: Lichtmikroskopische Aufnahme der Kontroll-Alizarinrotfärbung der hMSCs im 3D Gel 7 Tage kultiviert ohne Differenzierungsmedium; DonorIn 6 – Passage 2



Abbildung 26: Lichtmikroskopische Bestätigung der osteogenen Differenzierung der hMSCs mittels Alizarinrotfärbung nach 14 Tagen 2D Zellkultur; DonorIn 6 – Passage 2

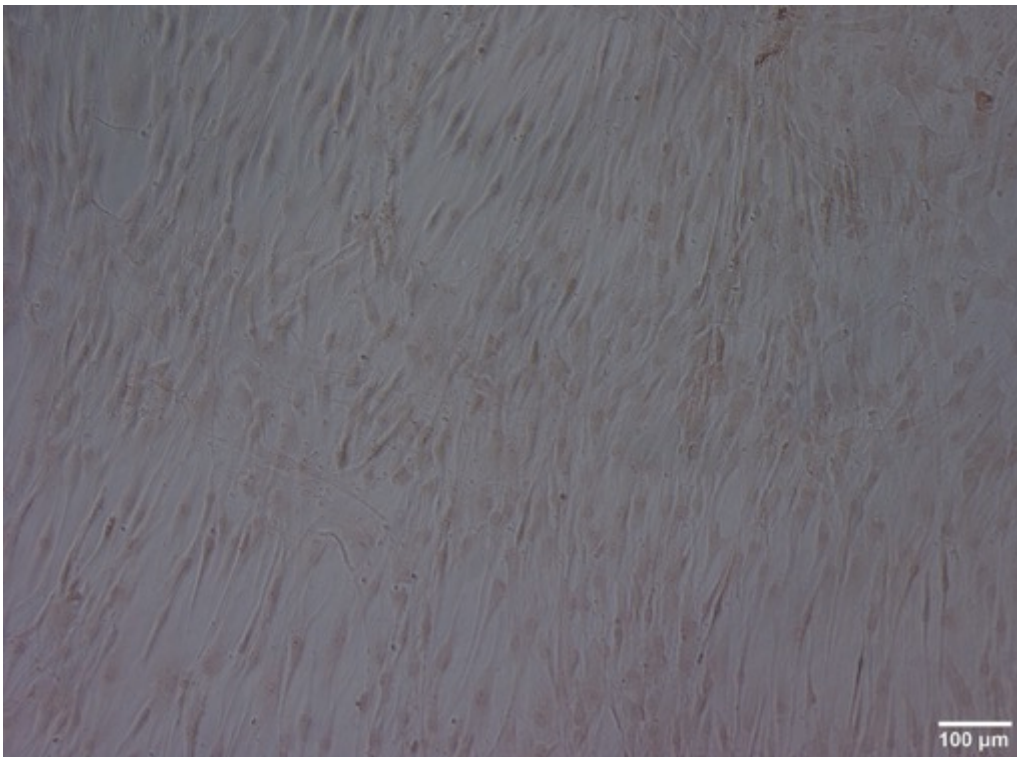


Abbildung 27: Lichtmikroskopische Aufnahme der Kontroll-Alizarinrotfärbung der undifferenzierten hMSCs nach 14 Tagen 2D Zellkultur; DonorIn 6 – Passage 2

Vergleicht man die Abbildungen 26 und 27 miteinander, sieht man abseits der Alizarinrotfärbung auch deutlich, dass sich die Zellen im Differenzierungsmedium morphologisch verändert haben. Verglichen mit den hMSCs (länglich, spindelförmig) sind sie deutlich runder und wachsen dichter zusammen. Die osteogen differenzierten Gele wirkten auch makroskopisch dichter. Inspektorisch hatte es den Anschein als wären sie etwas geschrumpft.

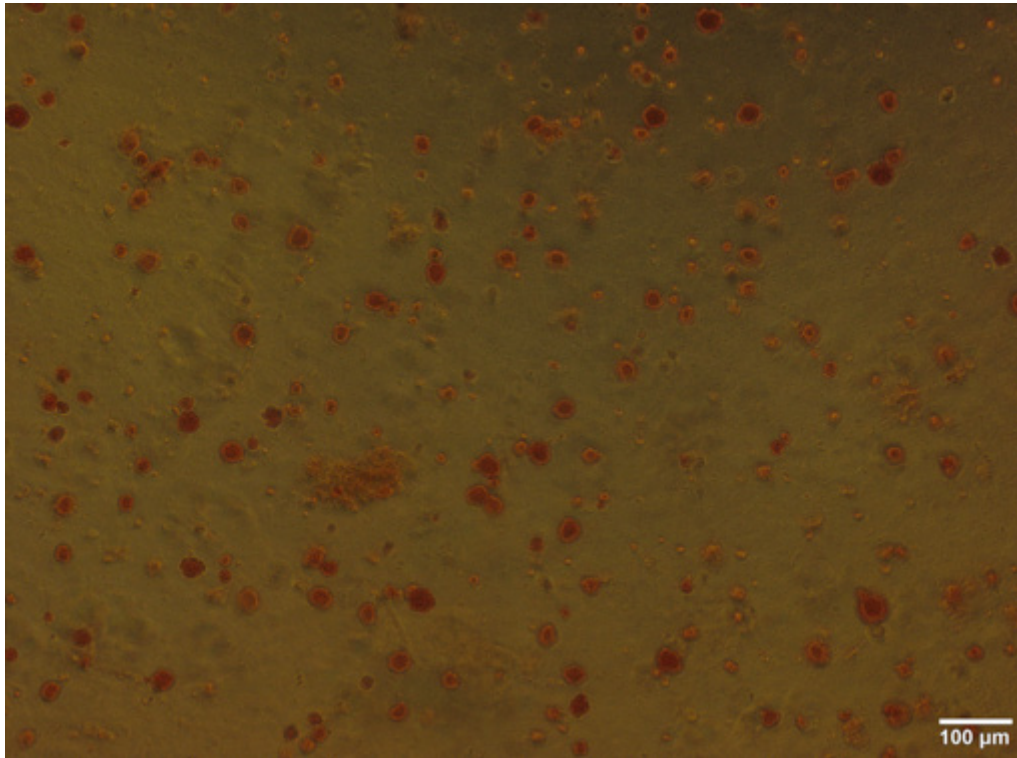


Abbildung 28: Lichtmikroskopische Bestätigung der osteogenen Differenzierung der hMSCs mittels Alizarinrotfärbung nach 14 Tagen Zellkultur im 3D Gel mit osteogenem Differenzierungsmedium; DonorIn 2 – Passage 2

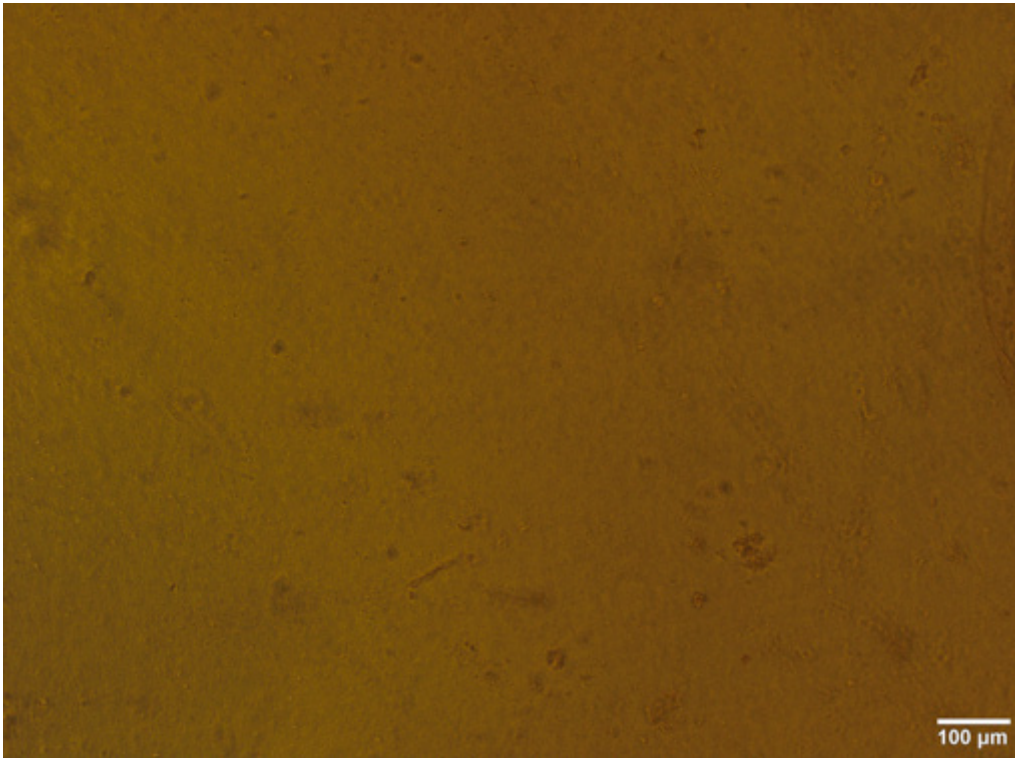


Abbildung 29: Lichtmikroskopische Aufnahme der Kontroll-Alizarinrotfärbung der hMSCs, die 14 Tage im 3D Gel ohne Differenzierungsmedium kultiviert wurden; DonorIn 2 – Passage 2

Im Zuge dieser Untersuchungen konnte abermals kein Unterschied im Differenzierungsverhalten der DonorInnen in Bezug auf Alter und Geschlecht festgestellt werden.

Anhand der Alizarinrot-Färbung konnte gezeigt werden, dass sich die hMSCs sowohl im 2D, als auch im 3D Modell in Osteoblasten differenzieren lassen. Da sich die hMSCs ausreichend viabel und differenzierungsfähig zeigten, wurden im nächsten Schritt Implantate (Mg10Gd, Ti) in die 3D Modelle eingebracht. Daraufhin wurde das Abbauverhalten der Implantate im 3D Knochenmodell mit Hilfe von μ CT-Scans untersucht.

8.4 Evaluierung des Implantatabbauverhaltens mittels μ CT-Scans

Um etwaige Unterschiede im Abbauverhalten von Mg10Gd und Ti Implantaten untersuchen zu können, wurden μ CT-Scans angefertigt.

Bei der Erstbetrachtung der μ CT-Bilder konnten bei den in die Gele implantierten Titan-Pins gravierende Störeffekte festgestellt werden. Bei der Gruppe mit Magnesium-Implantaten fielen diese, verglichen mit einem implantatfreiem Gel, viel geringer aus (siehe Abb.: 30).

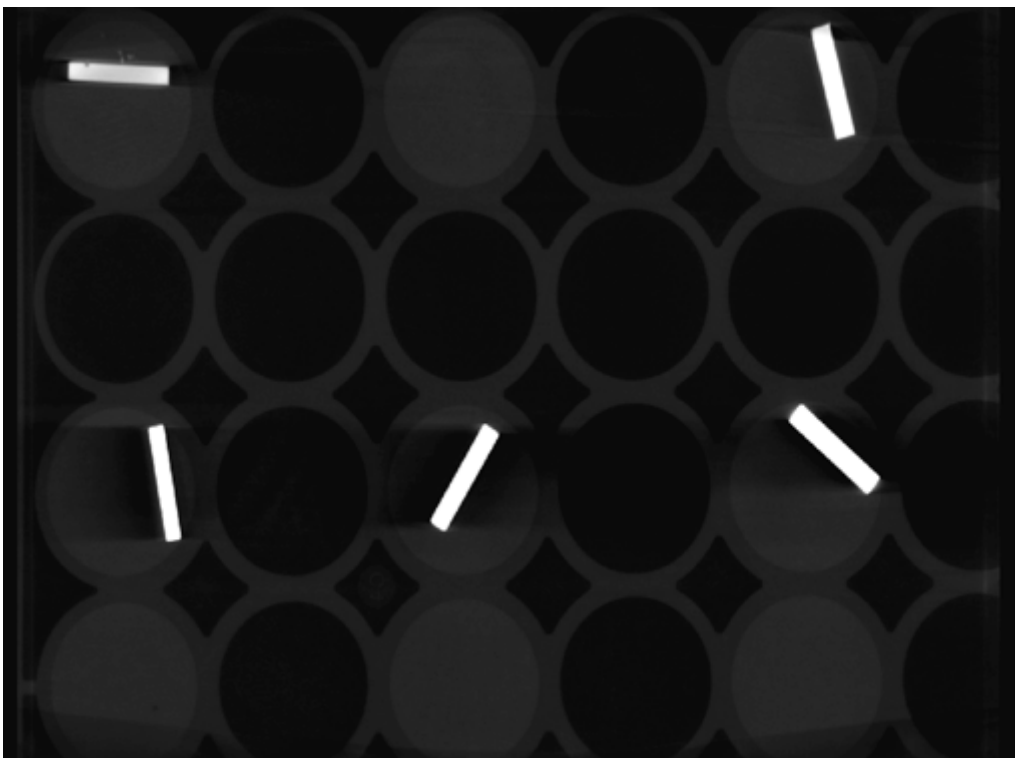


Abbildung 30: Vergleich der Störeffekte von Mg-Implantaten (oben) mit Ti-Implantaten (Mitte) und einem implantatfreiem Gel (unten) in einem μ CT-Schnittbild

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, entsteht beim Abbau von Magnesium-Implantaten Hydrogengas. In den μ CT-Bildern wurde sowohl bei den Gelen mit osteogen differenzierten hMSCs, als auch bei den Gelen mit undifferenzierten Stammzellen bei der Anwesenheit von Magnesium-Implantaten eine deutliche Blasenbildung beobachtet. Bei den Gelen mit Titanimplantaten war die Blasenbildung (mit Ausnahme der (Luft)-Blasenbildung durch das Einbringen der Implantate) wenig bis gar nicht zu sehen.

Die Blasenbildung war in der Gruppe mit den Magnesium-Pins sowohl an Tag 1, als auch an Tag 13 der Untersuchungen sichtbar. Anhand der μ CT-Aufnahmen konnte allerdings

nicht festgestellt werden, ob die Blasenbildung bei den osteogen differenzierten oder undifferenzierten hMSCs von Tag 1 bis Tag 13 zu- oder abgenommen hat, da die einzelnen Schnittbilder schwer miteinander vergleichbar waren. Da die 3D Gele bis Tag 13 deutlich an Masse verloren haben, konnte die Blasenbildung bei der Magnesium Gruppe auch makroskopisch festgestellt werden.

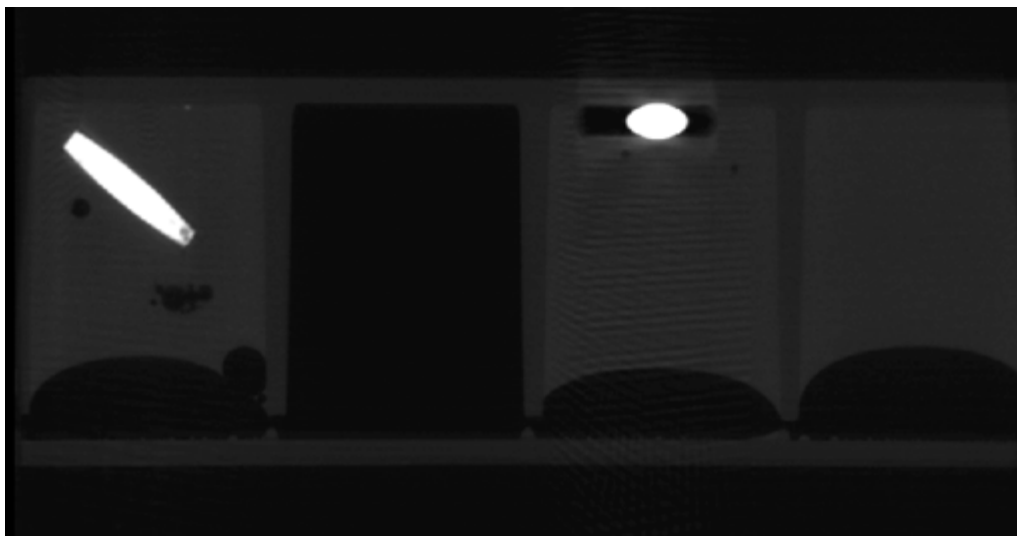


Abbildung 31: Die μ CT-Aufnahme nach 1 Tag Zellkultur im 3D Gel mit osteogen diff. hMSCs zeigt eine Blasenbildung bei Mg (links), kleine Luftblasen bei Ti (Mitte) sowie implantatfreiem Gel (rechts); DonorIn 5 – Passage 3



Abbildung 32: Die μ CT-Aufnahme nach 1 Tag Zellkultur im 3D Gel mit undiff. hMSCs zeigt eine Blasenbildung bei Mg (links), kleine Luftblasen bei Ti (Mitte) sowie implantatfreiem Gel (rechts); DonorIn 6 – Passage 3



Abbildung 33: Die μ CT-Aufnahme nach 13 Tagen Zellkultur im 3D Gel mit osteogen diff. hMSCs zeigt eine Blasenbildung bei Mg (rechts), kleine Luftblasen bei Ti (Mitte) sowie implantatfreiem Gel (links); DonorIn 5 – Passage 3

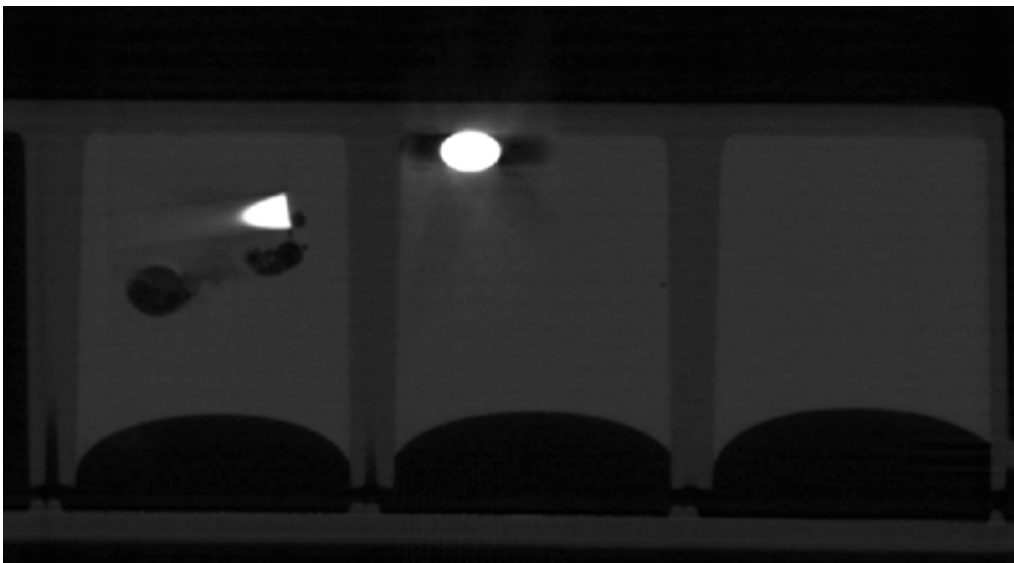


Abbildung 34: Die μ CT-Aufnahme nach 13 Tagen Zellkultur im 3D Gel mit undiff. hMSCs zeigt eine Blasenbildung bei Mg (links), kleine Luftblasen bei Ti (Mitte) sowie implantatfreiem Gel (rechts); DonorIn 6 – Passage 3

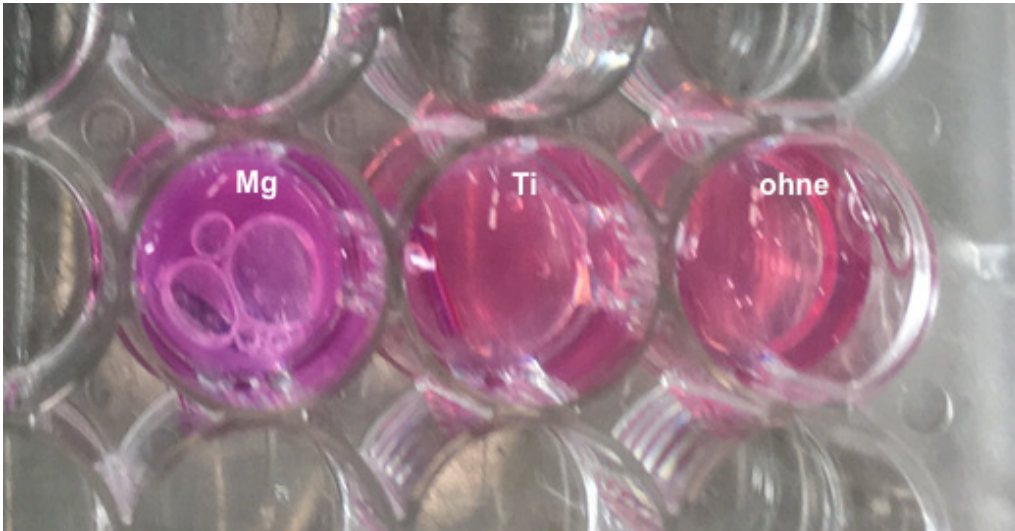


Abbildung 35: Die makroskopische Aufnahme nach 13 Tagen Zellkultur im 3D Gel mit undiff. hMSCs zeigt eine deutliche Blasenbildung im 3D Gel mit Mg-Implantat; DonorIn 6 – Passage 3

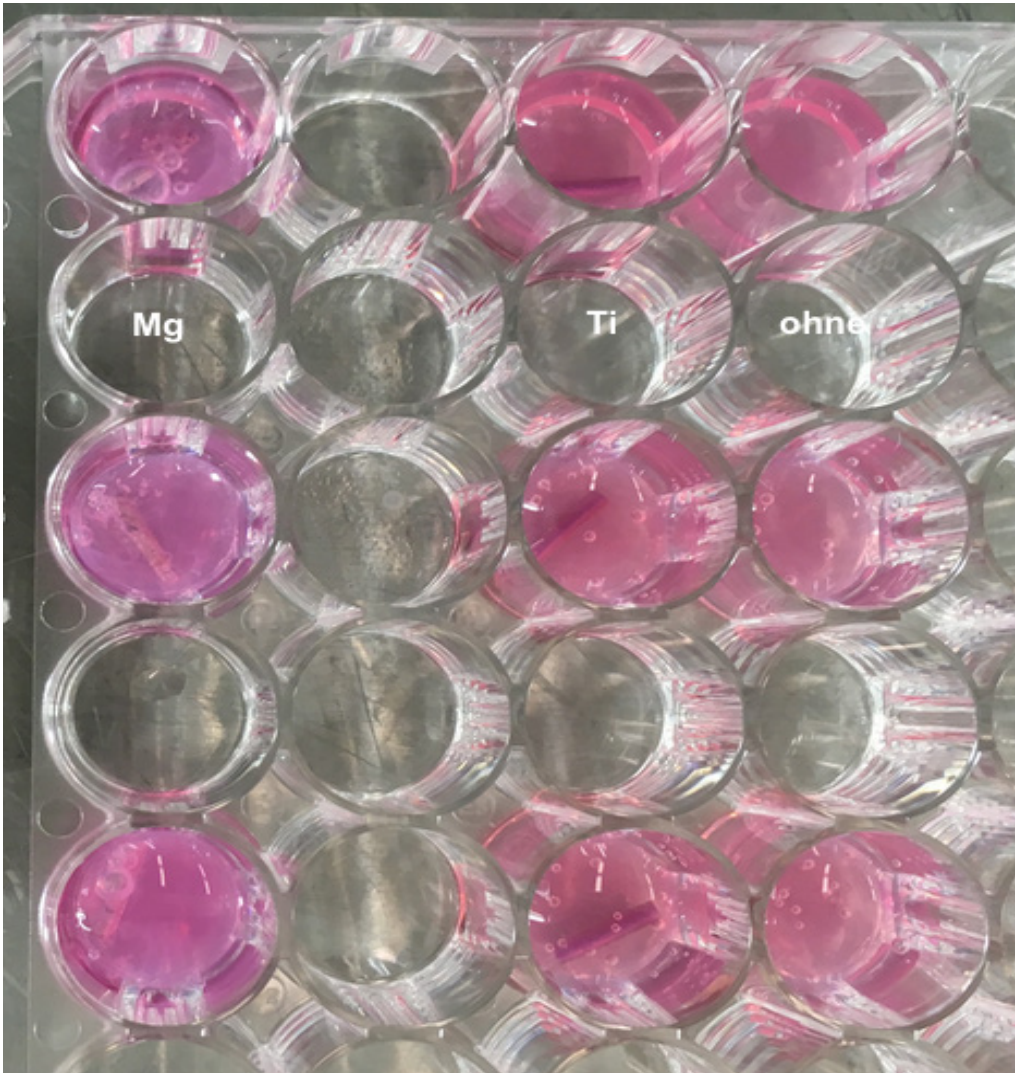


Abbildung 36: Die makroskopische Aufnahme nach 13 Tagen Zellkultur im 3D Gel mit osteogen diff. hMSCs zeigt eine deutliche Blasenbildung bei den 3D Gelen mit Mg-Implantaten, sowie Luftblasen in den Gelen mit Ti-Implantaten und in den implantatfreien Gelen; DonorInnen 4, 5, 6 (von oben nach unten) – Passage 3

In weiterer Folge konnte sowohl im μ CT als auch makroskopisch ein eindeutiger Substanzverlust der Gele mit Mg-Pins im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen von Tag 1 bis Tag 13 festgestellt werden. Dieser fiel besonders bei den Gelen mit osteogen differenzierten Zellen auf.

	DonorIn 4	DonorIn 5	DonorIn 6	Durchschnitt
Tag 1	12,08 mm	12,34 mm	12,86 mm	12,43 mm
Tag 13	9,84 mm	9,72 mm	8,77 mm	9,44 mm

Tabelle 8: Höhe der Gele mit osteogen diff. hMSCs und mit Mg10Gd-Implantaten an Tag 1 und 13

	DonorIn 4	DonorIn 5	DonorIn 6	Durchschnitt
Tag 1	12,27 mm	12,93 mm	12,60 mm	12,60 mm
Tag 13	11,94 mm	12,57 mm	11,62 mm	12,04 mm

Tabelle 9: Höhe der Gele mit osteogen diff. hMSCs und mit Ti-Implantaten an Tag 1 und 13

	DonorIn 4	DonorIn 5	DonorIn 6	Durchschnitt
Tag 1	12,40 mm	12,01 mm	12,60 mm	12,34 mm
Tag 13	11,80 mm	11,40 mm	11,04 mm	11,41 mm

Tabelle 10: Höhe der Gele mit osteogen diff. hMSCs ohne Implantate an Tag 1 und 13

Die Höhe der 3D Gele mit osteogen differenzierten hMSCs mit Mg-Implantaten betrug 12.34 mm, 12.86 mm und 12.08 mm an Tag 1. Bei den Gelen mit Ti-Implantaten betrug diese 12.93 mm, 12.60 mm und 12.27 mm an Tag 1. Bei den 3D Gelen ohne Implantate betrug die Höhe 12.01 mm, 12.60 mm und 12.40 mm an Tag 1. Im Durchschnitt waren die 3D Gele mit Mg-Pins also 12.43 mm, mit Ti-Pins 12.60 mm und ohne Implantate 12.34 mm hoch. Der Unterschied zwischen den drei Gruppen an Tag 1 betrug also maximal 0,26 mm, was einer Abweichung von 2 % entspricht (siehe Abb.: 37 und Tabelle 8, 9, 10).

An Tag 13 betrug die Höhe der Gele mit osteogen differenzierten Stammzellen mit Mg-Implantaten 9.84 mm, 9.72 mm und 8.77 mm. Mit Ti-Implantaten waren die Gele an Tag 13 11.94 mm, 12.57 mm und 11.62 mm hoch, ohne Implantate waren sie 11.80 mm, 11.40 mm und 11.04 mm hoch. Im Durchschnitt waren die 3D Gele mit Mg-Pins also 9.44 mm, mit Ti-Pins 12.04 mm und ohne Implantate 11.41 mm hoch. Der Unterschied zwischen den drei Gruppen betrug daher durchschnittlich 2.6 mm, was einer Abweichung von 21,6 % entspricht (siehe Abb.: 38; Tabelle 8, 9, 10). Da der p-Wert aufgrund der niedrigen Probenanzahl ($n = 3$) nicht aussagekräftig gewesen wäre, wurde dieser hier nicht berechnet.

Vergleicht man nun die durchschnittlichen Höhen der 3D Gele mit osteogen differenzierten hMSCs mit Mg-Implantaten mit jenen der implantatfreien Gele an Tag 1,

sieht man einen Unterschied von 0,09 mm (0,7 %) in der Höhe. Zieht man diesen Vergleich an Tag 13, sieht man einen Unterschied von 1.97 mm (17,3 %) in der Höhe. Die Gele mit Mg-Implantaten sind also ungefähr um durchschnittlich 2 mm geschrumpft. Die 3D Gele mit Titanimplantaten sind an beiden Untersuchungstagen etwas größer, als die Gele ohne Implantate.

Die Höhe des 3D Gels mit undifferenzierten Stammzellen betrug an Tag 1 mit Mg-Implantat 12.15 mm, mit Ti-Implantat 12.10 mm und ohne Implantat 12.06 mm (siehe Abb.: 39). Dies entspricht einem maximalen Unterschied von 0.09 mm (0,7 %). An Tag 13 waren diese 10.38 mm, 11.60 mm bzw. 10.84 mm hoch (siehe Abb.: 40). Dies entspricht einem maximalen Höhenunterschied von 1.22 mm (10,5 %). Der Unterschied zwischen dem implantatfreien Gel und dem Gel mit Mg-Implantat beträgt jedoch nur 0.46 mm (4,2 %). Der Substanzverlust der 3D Gele mit osteogen differenzierten Stammzellen fiel demzufolge größer aus, als jener der 3D Gele mit undifferenzierten hMSCs.

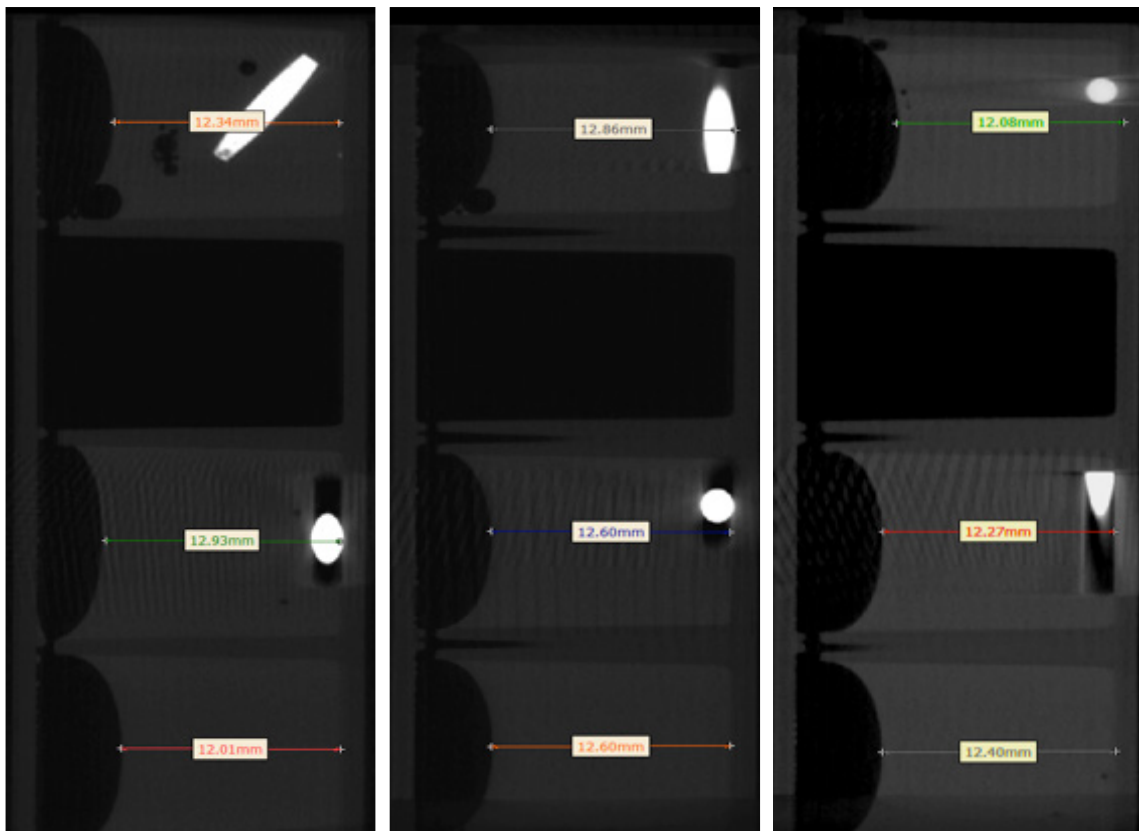


Abbildung 37: Das µCT-Schnittbild an Tag 1 zeigt einen Höhenvergleich der 3D Gele mit diff. hMSCs mit Mg-Implantat (oben), Ti-Implantat (Mitte) und einem implantatfreien Gel (unten); DonorInnen 5, 6, 4 (von li. nach re.) – Passage 3

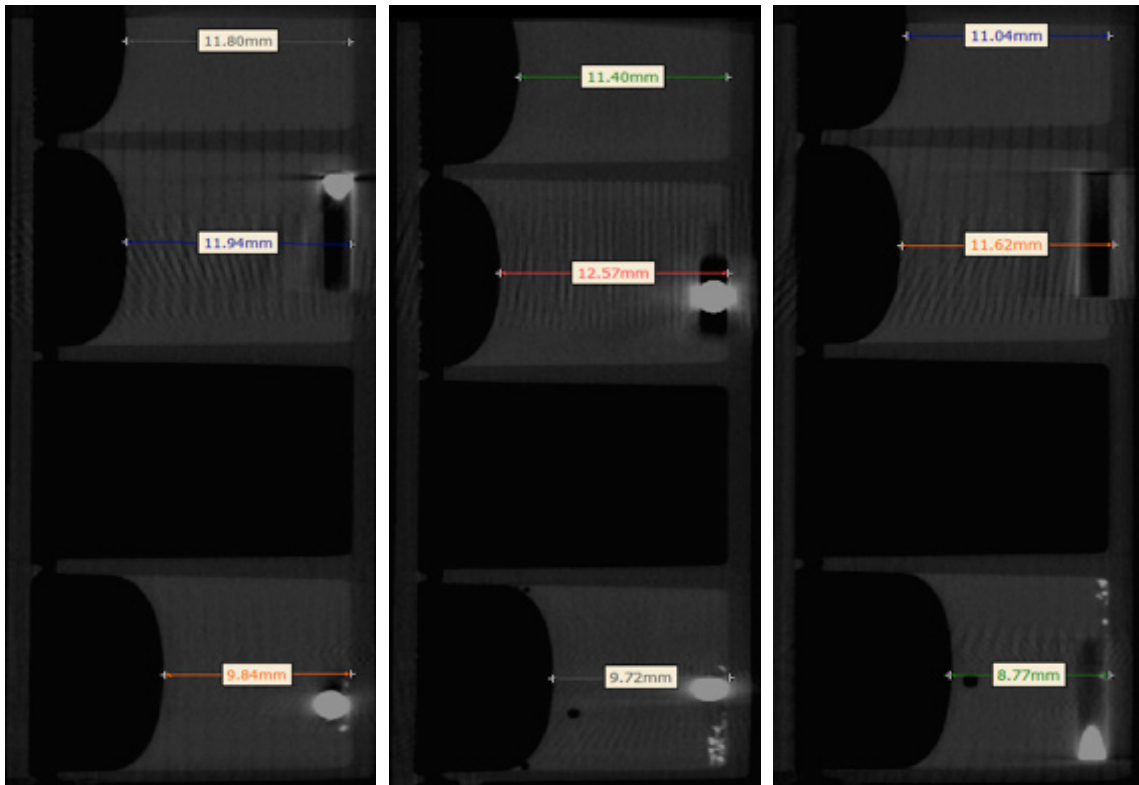


Abbildung 38: Das μ CT-Schnittbild an Tag 13 zeigt einen Höhenvergleich der 3D Gele mit diff. hMSCs mit Mg-Implantat (unten), Ti-Implantat (Mitte) und einem implantatfreien Gel (oben); DonorInnen 4, 5, 6 (von li. nach re.) – Passage 3

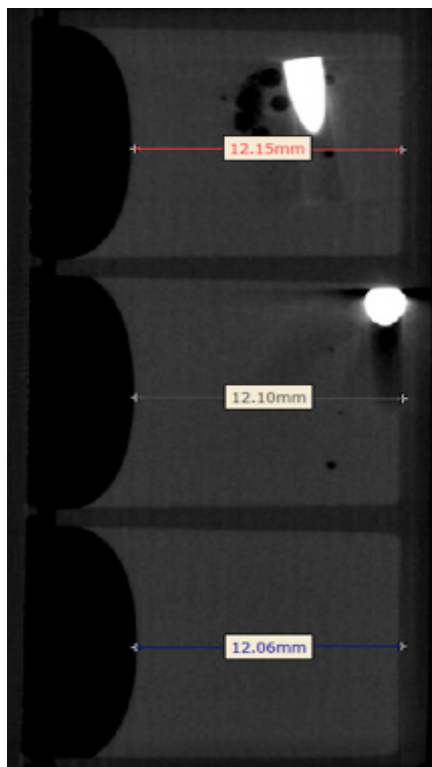


Abbildung 39: Das μ CT-Schnittbild an Tag 1 zeigt einen Höhenvergleich der 3D Gele mit undiff. hMSCs mit Mg-Implantat (oben), Ti-Implantat (Mitte) und einem implantatfreien Gel (unten); DonorIn 6 – Passage 3

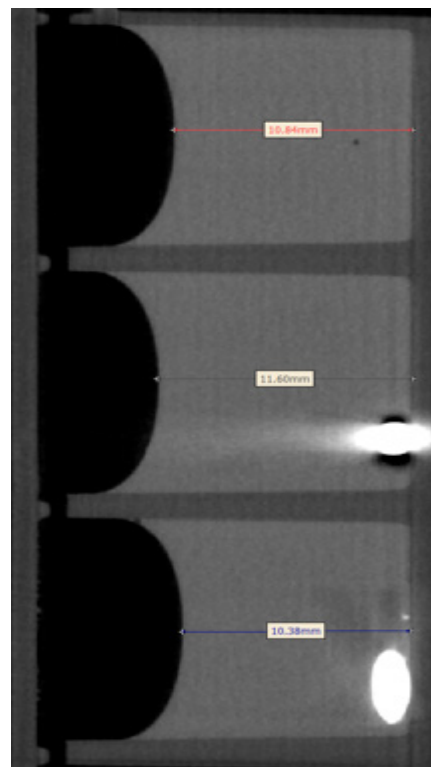


Abbildung 40: Das μ CT-Schnittbild an Tag 13 zeigt einen Höhenvergleich der 3D Gele mit undiff. hMSCs mit Mg-Implantat (unten), Ti-Implantat (Mitte) und einem implantatfreien Gel (oben); DonorIn 6 – Passage 3

Wie bereits erwähnt, wurde bereits ab dem 1. Tag, nachdem die Implantate in die 3D Gele eingesetzt worden waren, eine Blasenbildung bei jenen mit Mg-Implantaten beobachtet. Dies lässt darauf schließen, dass der Abbau der Mg-Implantate schon sehr früh begonnen hat. Eine 3D Rekonstruktion aller Implantate zeigte die beginnende Degradation der Mg-Implantate verglichen mit den Ti-Implantaten genauer. In Abbildung 41 und 42 wurde bereits an Tag 1 eine beginnende Auflösung der äußersten Schicht der Magnesiumstäbe gesehen, wohingegen die Titanstäbe eine glatte und makellose Oberfläche vorwiesen.

Bei den Gelen mit osteogen differenzierten Stammzellen wurde bis Tag 13 eine deutliche Zunahme der Degradation der Mg-Implantate in den 3D Rekonstruktionen beobachtet (vergleiche Abb.: 41 mit 43). Einer der Mg-Stäbe zeigte demnach einen verstärkten Zerfall der äußersten Schicht mit kleinen Absprengungen. Ein weiterer Stab zeigte bei genauer Betrachtung einen beginnenden Zerfall eines Stabendes und eine teilweise impromierte Oberfläche. Einer der untersuchten Stäbe hatte sich in dieser Zeit sogar um ungefähr $\frac{1}{4}$ verkleinert und zeigte eindeutige Absprengungen auf seiner gesamten Oberfläche.

Bei den 3D Gelen mit undifferenzierten Stammzellen und Mg-Implantaten konnte eine verstärkte Degradation von Tag 1 bis 13 anhand der μ CT-Bilder weder ausgeschlossen, noch bestätigt werden. Die Stäbe zeigten an Tag 13 eine rauer wirkende und unebenere Oberfläche als an Tag 1. Der Unterschied an beiden Untersuchungstagen ist jedoch nicht signifikant genug, um eine Aussage bezüglich eines verstärkten Abbaus treffen zu können (siehe Abb.: 42 + 44).

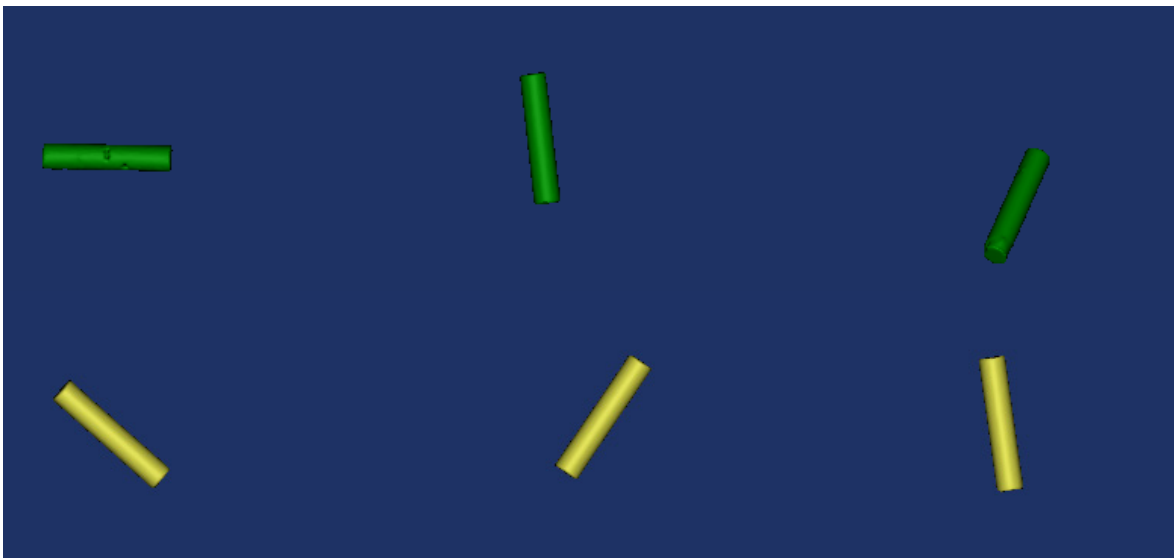


Abbildung 41: Vergleich der Degradation von Mg-Implantaten (oben) mit Ti-Implantaten (unten) an Tag 1 in 3D Modellen mit osteogen diff. Zellen mit Hilfe einer 3D Rekonstruktion der Implantate; DonorInnen 4, 5, 6 (von li. nach re.) – Passage 3

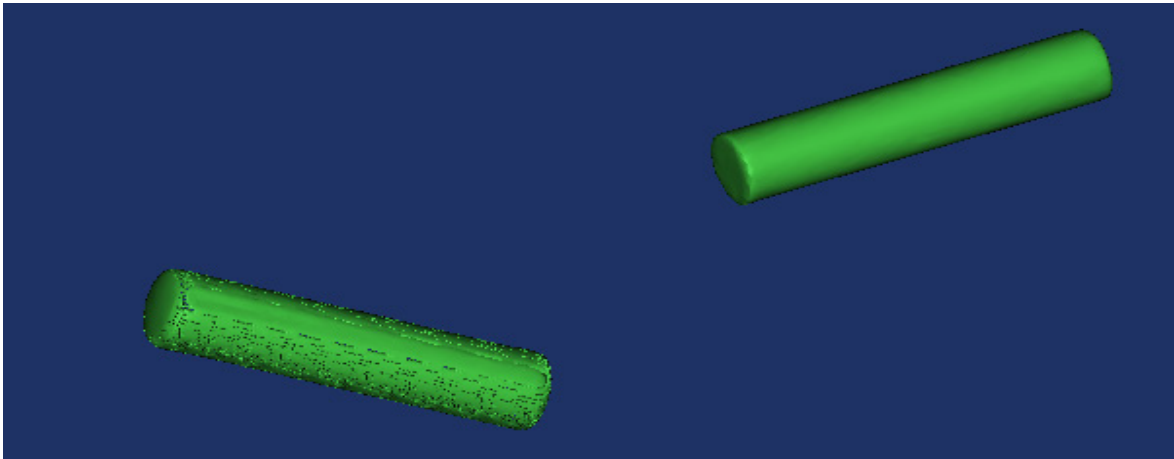


Abbildung 42: Vergleich der Degradation eines Mg-Implantes (unten) mit einem Ti-Implantat (oben) an Tag 1 in einem 3D Modell mit undiff. Zellen mit Hilfe einer 3D Rekonstruktion der Implantate; DonorIn 6 – Passage 3

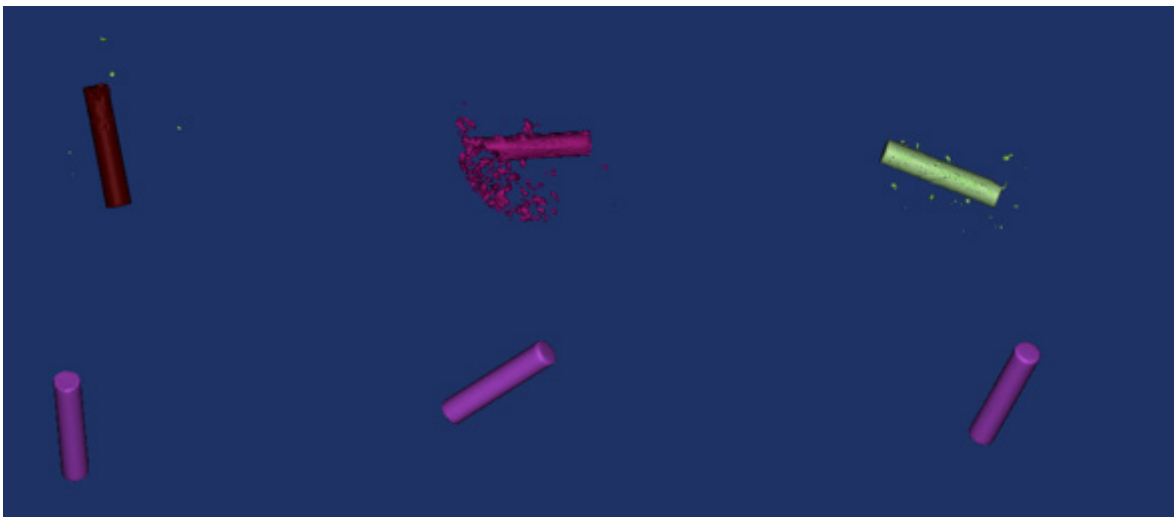


Abbildung 43: Vergleich der Degradation von Mg-Implanten (oben) mit Ti-Implantaten (unten) an Tag 13 in 3D Modellen mit osteogen diff. Zellen mit Hilfe einer 3D Rekonstruktion der Implantate; DonorInnen 4, 5, 6 (von li. nach re.) – Passage 3



Abbildung 44: Vergleich der Degradation von Mg-Implanten (rechts) mit Ti-Implantaten (links) an Tag 13 in 3D Modellen mit undiff. Zellen mit Hilfe einer 3D Rekonstruktion der Implantate; DonorIn 6 – Passage 3

Bei genauer Betrachtung konnte man die Degradation der Mg-Stäbe, durch weißliche Auflagerungen an der Staboberfläche auch makroskopisch eindeutig sehen. Diese fiel an Tag 13 bei den differenzierten Gelen deutlicher als bei den undifferenzierten auf. (siehe Abb.: 45).



Abbildung 45: Die makroskopische Aufnahme an Tag 13 zeigt eine deutliche Degradation der Mg-Stäbe im 3D Gel mit osteogen diff. (li) und undiff. (re) Zellen; DonorIn 6 – Passage 3

Die Titanstäbe zeigten an Tag 13 bei beiden Gruppen (diff. vs. undiff.) eine glatte Oberfläche und keine Degradationszeichen (siehe Abb.: 46).

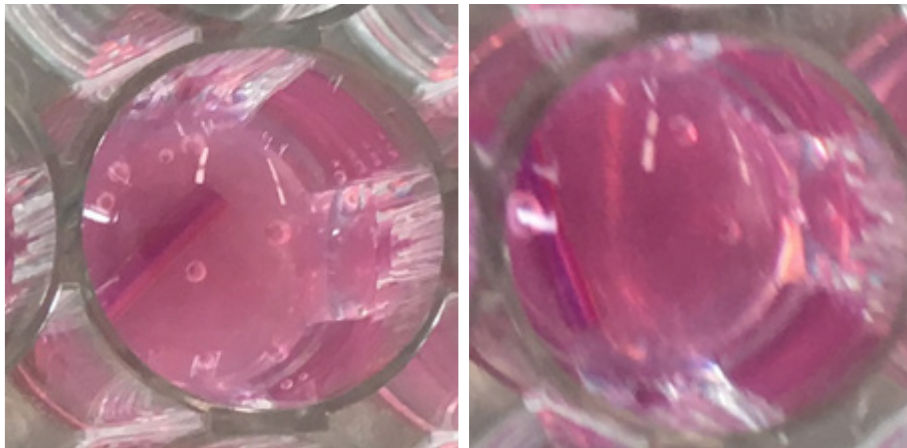


Abbildung 46: Die makroskopische Aufnahme an Tag 13 zeigt keinerlei Degradationsanzeichen der Ti-Stäbe in den 3D Gelen mit osteogen diff. (li) bzw. undiff. (re) Zellen; DonorIn 6 – Passage 3

Zusammenfassend konnte die zunehmende Degradation der Mg-Implantate über den Untersuchungszeitraum von 13 Tagen sowohl makroskopisch, als auch genauer in den μ CT-Scans beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten die Ti-Implantate im Untersuchungszeitraum keinerlei Degradationszeichen. Im nächsten Schritt sollte sodann das Einwachsverhalten der Implantate ins 3D Modell untersucht werden.

8.5 Evaluierung des Einwachsverhaltens der Implantate mittels Pull-out Testung

Die implantierten Pins sollten in Kooperation mit der TU Wien mit Hilfe von Pull-out-Tests bezüglich ihres Einwachsverhaltens in das 3D Gel evaluiert werden. Die 3D Gele wurden jedoch nicht hart genug, sodass die Pins beim Entfernen der 3D Gele aus der 48-Well Platte herausgefallen sind und die Pull-out Testung somit nicht möglich war.

In weiterer Folge wurde versucht, die 3D Gele inklusive Pins mit Isopropanol und Xylol zu fixieren, um sie mittels HE-Färbung anfärben und mikroskopisch untersuchen zu können. Allerdings waren die Gele nach dem Fixierungsvorgang immer noch zu weich und die Implantate fielen auch hier wieder aus den Gelen heraus.

9 Diskussion

In dieser Pilotstudie wurde ein 3-dimensionales Knochenmodell auf Kollagenbasis in Kombination mit humanen Stammzellen aus humanen Femurkopfspenden entwickelt. Dabei konnten pro DonorIn ungefähr 2 Millionen hMSCs erfolgreich isoliert werden, die in weiterer Folge eine Überlebensrate von annähernd 100 % über 14 Tage zeigten. Zusätzlich ließen sich die hMSCs auch problemlos in Osteoblasten weiter differenzieren, was sowohl mit der Alizarinrot-Färbung, als auch lichtmikroskopisch durch morphologische Änderungen der Zellen, bestätigt werden konnte. Mit dem verwendeten Isolationsprotokoll konnten daher überlebensfähige und differenzierungsfähige Stammzellen gewonnen werden. Da die verwendeten Methoden zur Viabilitäts- und Differenzierungskontrolle etabliert sind (Methode nach der Arbeit von Cecchinato et al., Myrissa et al. und Yan et al. bzw. Willbold et al.), kann das in dieser Arbeit verwendete Isolationsprotokoll unbesorgt für weitere Arbeiten empfohlen werden (Cecchinato et al., 2015; Myrissa et al., 2016; Willbold et al., 2016; Yan et al., 2014).

Im Zuge der Arbeit wurden sodann die zu untersuchenden biodegradierbaren Magnesium-Implantate (Mg10Gd), sowie biostabile Titanimplantate zur Kontrolle in die 3D Modelle eingebaut, um deren Abbauverhalten in den ersten 13 Tagen zu untersuchen. Das Degradationsverhalten der Implantate war in den geschaffenen Knochenmodellen gut erkennbar und konnte mit Hilfe von μ CT-Scans beschrieben werden. Wie zu erwarten war, zeigten die Scans eine deutlich erkennbare Degradation der abbaubaren Magnesium-Implantate, sowie keine Abbaueichen bei den klinisch etablierten und biostabilen Titanimplantaten. Da sich die Mg10Gd-Implantate sehr unterschiedlich abgebaut haben, ist ein Vergleich mit aktueller Literatur schwer möglich. Daher ist es notwendig, eine weitere Untersuchungsreihe mit einer größeren Fallzahl durchzuführen.

Über das Einwachsverhalten der getesteten Implantate konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden. Dieses soll sodann in zukünftigen Studien mittels des hier entwickelten 3D Modells untersucht und mit Ergebnissen aus Tierversuchen verglichen werden.

In der „in vitro“ Forschung werden 2D und 3D Modelle verwendet. Lai et al., Matthews et al. und Myrissa et al. zeigten in ihren Arbeiten, dass 3D Kulturen den 2D Kulturen deutlich

überlegen sind, da sie die *in vivo* Situation klarer widerspiegeln (Lai et al. 2013; Matthews et al., 2014 und Myrissa et al., 2016).

Auch in dieser Arbeit ist das 3D dem 2D Modell deutlich überlegen. Im 3D Modell wurden die Implantate vollständig ins Gel eingebracht, was der *in vivo* Situation entspricht. Im 2D Modell hingegen ist dies nicht möglich. Außerdem wurden die Implantate im 3D Modell einer Umgebung mit 40 Mal so vielen Zellen ausgesetzt, wodurch die *in vivo* Situation besser simuliert werden kann. Die Aussagen der oben genannten Autoren konnten somit in dieser Arbeit bestätigt werden. Aus den oben genannten Gründen sollte das 3D Modell als „State of Art“ in der „*in vitro*“ Forschung verwendet werden.

Willbold et al. beschreiben, dass die Korrosionsrate von degradierbaren Implantaten, wie Mg, volumetrisch, gravimetrisch, elektrochemisch und über Gas und Ionen Freisetzung ermittelt werden kann (Willbold et al., 2016). Sie beschreiben zusätzlich, dass sich die Degradationsrate von Magnesiumverbindungen über einen längeren Zeitraum gesehen ändert, weshalb sie über einen langen Zeitraum beobachtet werden sollte (Willbold et al., 2016).

In dieser Arbeit wurde die Degradation der Implantate quantitativ mittels μ CT und anschließender Rekonstruktion mittels Mimics untersucht. Diese Methode ist gering invasiv, wodurch der Degradationsvorgang über einen langen Zeitraum beobachtet werden kann. Außerdem sind CT-Untersuchungen schnell durchführbar und sowohl „*in vitro*“ als auch „*in vivo*“ anwendbar. Somit können „*in vivo*“ und „*in vitro*“ Ergebnisse gut miteinander verglichen werden, was Myrissa et al. in ihrer Arbeit zeigten (Myrissa et al., 2016).

Die Zellviabilität und osteogene Differenzierung wurden in dieser Arbeit mittels der etablierten Methoden Lebend/Tod-Färbung und Alizarinrot-Färbung evaluiert (Cecchinato et al., 2015; Myrissa et al., 2016; Willbold et al., 2016; Yan et al., 2014). Nach Anpassung des Durchführungsprozesses der Färbemethoden im 3D Modell (7.2.9 bzw. 7.2.10) lieferten sie schließlich auch im Rahmen dieser Arbeit die geforderten Informationen bezüglich Überlebensfähigkeit und osteogener Differenzierbarkeit der hMSCs.

Wie Marukawa et al. und Windhagen et al. in ihren Arbeiten bereits beschrieben haben, wurden auch im Zuge dieser Arbeit Störeffekte bei CT-Untersuchungen durch Titanimplantate festgestellt (Marukawa et al., 2015; Windhagen et al., 2013). Abbildung 30 zeigt, dass etwa $\frac{2}{3}$ der Gelfläche durch Störeffekte bedeckt sind. Eine qualitative und auch quantitative Beurteilung ist somit nicht möglich. Auch die Abbildungen 37 und 38 weisen deutliche Störeffekte über ungefähr $\frac{2}{3}$ der Gelfläche durch Ti-Implantate auf, wodurch diese Fläche sehr schlecht beurteilbar ist. Im Gegensatz dazu waren solcherlei Störungen bei den Magnesium-Implantaten in deutlich geringerem Ausmaß wahrzunehmen. In Abbildung 30 beträgt die nichtbeurteilbare Fläche durch das Mg-Implantat lediglich 10 %. Das Mg-Implantat weist außerdem in den Abbildungen 37 und 38 deutlich geringere Störeffekte auf, wodurch die untersuchte Fläche besser beurteilbar ist. Hinsichtlich Störeffekten sind somit Mg-Implantate den Ti-Implantaten vorzuziehen, was deutliche Vorteile für die klinische Anwendbarkeit in der postoperativen Bildgebung ergibt.

Im Zuge der μ CT-Untersuchungen wurden außerdem die erwarteten Gasblasenbildungen in den 3D Knochenmodellen mit Magnesium-Implantaten festgestellt. Myrissa et al. beschreiben in ihrer Arbeit eine geringe Gasentwicklung 1 Woche nach Mg10Gd Implantation, das vermehrte Auftreten von Gashöhlen 4 Wochen nach Implantation, sowie keine offensichtlichen Gas-Höhlen 12 Wochen nach Implantation (Myrissa et al., 2016). In dieser Arbeit konnte 1 Tag nach Implantation (Abb.: 31, 32) von Mg10Gd und auch 13 Tage danach (Abb.: 33-36) eine deutliche Gasentwicklung mit Gashöhlenbildung beobachtet werden. Dabei ist die Gasentwicklung in unseren μ CT-Scans von Tag 13 sehr gut mit jener von einem in Sprague-Dawley® Ratten implantiertem Mg10Gd-Implantat nach 7 Tagen vergleichbar (Myrissa et al., 2016). Daraus lässt sich schließen, dass die Degradation von Mg10Gd schon sehr früh startet und unser Modell sich gut zur Vorhersage dieser frühen Degradation eignet.

Um genauere Aussagen bezüglich der Hydrogengasentwicklung von Mg10Gd im 3D Modell im Verlauf der Zeit treffen zu können, sollten demnach Untersuchungen über einen längeren Zeitraum (6 Wochen) durchgeführt werden. Außerdem wäre eine größere Probenzahl erforderlich, um genauere Aussagen treffen zu können.

Über den Untersuchungszeitraum von 13 Tagen konnte ein Substanzverlust der 3D Knochenmodelle festgestellt werden, welcher in der Gruppe mit Magnesium-Implantaten

besonders eindeutig ausfiel. Verglichen mit den implantatfreien Gelen war dieser um 17 % stärker ausgeprägt.

Die Degradationsreaktion von Magnesium im wässrigen Milieu lautet: $\text{Mg}_{(s)} + 2\text{H}_2\text{O}_{\text{aq}} \rightarrow \text{Mg}(\text{OH})_{2(s)} + \text{H}_{2(g)}$, wodurch Hydrogengas und Magnesiumhydroxid produziert werden (Chen et al., 2014). Das Hydrogengas konnte in weiterer Folge aus dem 3D Knochenmodell entweichen. Dadurch lässt sich der intensiviertere Substanzverlust auf den Degradationsvorgang der Mg-Implantate zurückführen. In den beiden anderen Gruppen (Titan / implantatfrei) lässt sich der beobachtete Abbau der Gelmasse durch den Flüssigkeits- und Nährstoffverbrauch der humanen Stammzellen innerhalb des 3D Modells erklären.

Myrissa et al. beschreiben 1 Woche nach Implantation von Mg10Gd wenig Veränderungen in der Oberflächenmorphologie des Implantates, 4 Wochen nach Implantation beschreiben sie eine lokalisierte Korrosion des Implantates (Myrissa et al., 2016). In dieser Arbeit zeigen sich hingegen sehr unterschiedliche Degradationsraten 13 Tage nach Implantation (Abb.: 43). Diese reichten von lokalisierter Korrosion, die mit dem Ergebnis von Myrissa et al. sehr gut vergleichbar ist, bis zu einem Substanzverlust von etwa 25 %. Aus diesem Grund müssen in zukünftigen Studien die Degradationsraten von Mg10Gd-Implantaten im 3D Modell anhand einer wesentlich höheren Anzahl untersucht werden, um signifikante Aussagen treffen zu können. Anschließend sollten die dann gewonnenen Ergebnisse mit jenen „in vivo“ verglichen werden, um zu überprüfen, ob sich das hier entwickelte „in vitro“ Modell zur Voraussage vom Abbauverhalten „in vivo“ eignet.

Dabei stellt die CT/μCT-Analyse ein hervorragendes Werkzeug für Degradationsanalysen dar. Es ist eine gering invasive Methode, die Untersuchungen über einen langen Zeitverlauf ermöglicht. Daher kann unsere Arbeitsgruppe diese Methode für zukünftige Arbeiten weiterempfehlen.

Aufschlüsse über das Einwachsverhalten von Implantaten in dem 3D Modell könnten histologische Untersuchungen bringen. Um das entwickelte 3D Knochenmodell histologisch untersuchen zu können, müsste die Festigkeit von diesem erhöht werden. Ein zäheres Modell könnte eventuell durch eine Erhöhung der Kollagenkonzentration oder der Anzahl an hMSCs erreicht werden.

Im Zuge dieser Arbeit wurden 2 gleich hergestellte 48-Well Platten mit 3D Knochenmodellen und Implantaten an Tag 1 bzw. 13 im μ CT-Gerät gescannt. Da es jedoch schwierig ist 2 komplett übereinstimmende Modelle von menschlicher Hand zu fertigen, wären die Ergebnisse noch exakter gewesen, wenn eine Platte an Tag 1 und eine sowohl an Tag 1, als auch Tag 13 untersucht worden wäre. Des Weiteren hätten die Knochenmodelle zusätzlich noch unmittelbar (Tag 0), sowie 1 Woche (Tag 7) nach deren Herstellung im μ CT untersucht werden können, um eine noch detailliertere Beschreibung der beobachteten Entwicklungen zu ermöglichen. Durch die oben genannten Änderungen wäre es möglich gewesen die Entstehung von Hydrogenblasen, das Fortschreiten der Implantatdegradation und den entdeckten Substanzverlust der 3D Knochenmodelle ausführlicher zu beschreiben. Um zusätzlich Aussagen bezüglich der Biokompatibilität der untersuchten Materialien (Gg10Gd, Ti) treffen zu können, hätten die 3D Modelle an den Untersuchungstagen auch mittels Lebend/Tod-Färbung evaluiert werden sollen.

Aus Kostengründen und dem Umstand, dass es sich bei dieser Arbeit um eine Pilotstudie handelt, wurde nur eine geringe Anzahl an 3D Knochenmodellen hergestellt und über einen relativ kurzen Zeitraum untersucht. Um mehr Aussagekraft zu erlangen, sollten die hier entwickelten Modelle nun in größerer Anzahl und über einen längeren Zeitraum (6 Wochen – entspricht der Dauer einer Frakturheilung) untersucht werden. Parallel dazu sollten dieselben Implantate in einem Tierversuch mit den gleichen Methoden untersucht werden. Ein Vergleich der erlangten Ergebnisse (3D Knochenmodell / Tier) sollte sodann zeigen, ob das in dieser Arbeit entwickelte „in vitro“ 3D Knochenmodell die „in vivo“ Bedingungen nachahmen kann.

10 Literaturverzeichnis

- Cecchinato, F., Agha, N.A., Martinez-Sanchez, A.H., Luthringer, B.J.C., Feyerabend, F., Jimbo, R., Willumeit-Römer, R., Wennerberg, A., 2015. Influence of Magnesium Alloy Degradation on Undifferentiated Human Cells. *PloS One* 10, e0142117. doi:10.1371/journal.pone.0142117
- Chen, Y., Xu, Z., Smith, C., Sankar, J., 2014. Recent advances on the development of magnesium alloys for biodegradable implants. *Acta Biomater.* 10, 4561–4573. doi:10.1016/j.actbio.2014.07.005
- Collagen I Rat Protein, Tail - Thermo Fisher Scientific [WWW Document], n.d. URL https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Collagen_I_rat_tail_PI.pdf
- Gösling, T., Hufner, T., Hankemeier, S., Zelle, B.A., Muller-Heine, A., Krettek, C., 2004. Femoral Nail Removal Should Be Restricted in Asymptomatic Patients: *Clin. Orthop.* 423, 222–226. doi:10.1097/01.blo.0000130208.90879.67
- Herz-Weltpremiere in München: Dieser Stent löst sich selbst auf [WWW Document], 2016. URL <https://www.tz.de/leben/gesundheit/herz-weltpremiere-dieser-stent-magnesium-loest-sich-selbst-auf-6527231.html>
- Lai, W., Li, Y., Mak, S., Ho, F., Chow, S., Chooi, W., Chow, C., Leung, A., Chan, B., 2013. Reconstitution of bone-like matrix in osteogenically differentiated mesenchymal stem cell-collagen constructs: A three-dimensional in vitro model to study hematopoietic stem cell niche. *J. Tissue Eng.* 4, 2041731413508668. doi:10.1177/2041731413508668
- Liu, S., Wang, L., Gu, X., Wu, W., Xu, P., Chen, Z., 2010. [Clinical study of stress shielding after mini-plate internal fixation for mandibular fractures]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi Zhonghua Kouqiang Yixue Zazhi Chin. J. Stomatol.* 45, 474–476.
- Lohmann, C.H., Singh, G., Willert, H.-G., Buchhorn, G.H., 2014. Metallic debris from metal-on-metal total hip arthroplasty regulates periprosthetic tissues. *World J. Orthop.* 5, 660. doi:10.5312/wjo.v5.i5.660
- Long, T., Yang, J., Shi, S.-S., Guo, Y.-P., Ke, Q.-F., Zhu, Z.-A., 2015. Fabrication of three-dimensional porous scaffold based on collagen fiber and bioglass for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 103, 1455–1464. doi:10.1002/jbm.b.33328
- Martinez Sanchez, A.H., Luthringer, B.J.C., Feyerabend, F., Willumeit, R., 2015. Mg and Mg alloys: how comparable are in vitro and in vivo corrosion rates? A review. *Acta Biomater.* 13, 16–31. doi:10.1016/j.actbio.2014.11.048
- Marukawa, E., Tamai, M., Takahashi, Y., Hatakeyama, I., Sato, M., Higuchi, Y., Kakidachi, H., Taniguchi, H., Sakamoto, T., Honda, J., Omura, K., Harada, H., 2015. Comparison of magnesium alloys and poly-L-lactide screws as degradable implants in a canine fracture model. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* doi:10.1002/jbm.b.33470

Matthews, B.G., Naot, D., Callon, K.E., Musson, D.S., Locklin, R., Hulley, P.A., Grey, A., Cornish, J., 2014. Enhanced osteoblastogenesis in three-dimensional collagen gels. *BoneKey Rep.* 3, 560. doi:10.1038/bonekey.2014.55

Myrissa, A., Agha, N.A., Lu, Y., Martinelli, E., Eichler, J., Szakács, G., Kleinhans, C., Willumeit-Römer, R., Schäfer, U., Weinberg, A.-M., 2016. In vitro and in vivo comparison of binary Mg alloys and pure Mg. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 61, 865–874. doi:10.1016/j.msec.2015.12.064

Neidlinger-Wilke, C., 2006. Biokompatibilität von Implantatmaterialien. Seite 111–118

Özarlan, F., Arıkan, O., Acat, M., Arıkan, M., Temel, V., 2014. Intrathoracic migration of a Kirschner wire. *J. Surg. Case Rep.* 2014. doi:10.1093/jscr/rjt132

Papadimitropoulos, A., Scherberich, A., Güven, S., Theilgaard, N., Crooijmans, H.J.A., Santini, F., Scheffler, K., Zallone, A., Martin, I., 2011. A 3D in vitro bone organ model using human progenitor cells. *Eur. Cell. Mater.* 21, 445–458; discussion 458.

Ruffieux, K., Wintermantel, E., 2009. Degradable Implantate: Entwicklungsbeispiele, in: Wintermantel, E., Ha, S.-W. (Eds.), *Medizintechnik: Life Science Engineering*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1585–1599.

Syntellix AG, n.d. DIESE SCHRAUBE WIRD ZU KNOCHEN DAS INTELLIGENTERE IMPLANTAT! [WWW Document]. URL http://www.on-orthopaedie.de/wp-content/uploads/2015/10/MAGNEZIX_Patientenflyer_210915_DE-web.pdf

Willbold, E., Weizbauer, A., Loos, A., Seitz, J.-M., Angrisani, N., Windhagen, H., Reifenrath, J., 2016. Magnesium alloys: A stony pathway from intensive research to clinical reality. Different test methods and approval-related considerations. *J. Biomed. Mater. Res. A*. doi:10.1002/jbm.a.35893

Windhagen, H., Radtke, K., Weizbauer, A., Diekmann, J., Noll, Y., Kreimeyer, U., Schavan, R., Stukenborg-Colsman, C., Waizy, H., 2013. 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. *Biomed. Eng. Online* 12, 62. doi:10.1186/1475-925X-12-62

Yan, X.-Z., Yang, W., Yang, F., Kersten-Niessen, M., Jansen, J.A., Both, S.K., 2014. Effects of continuous passaging on mineralization of MC3T3-E1 cells with improved osteogenic culture protocol. *Tissue Eng. Part C Methods* 20, 198–204. doi:10.1089/ten.tec.2012.0412

Yao, J., Tang, H., Gao, X.-L., McGrath, C., Mattheos, N., 2014. Patients' expectations to dental implant: a systematic review of the literature. *Health Qual. Life Outcomes* 12. doi:10.1186/s12955-014-0153-9