# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Max Heiland

# Optimierung der Zytokompatibilitätsanalyse von Biomaterialien auf Magnesiumbasis und Entwicklung von plasmaanodisierten Magnesium-Implantatwerkstoffen

# Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Ole Jung aus Bremen

Hamburg 2015

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 22.06.2016

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. R. Smeets

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD. Dr. F. Barvencik

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:

# Meinen Eltern Meiner Tochter Greta

# Inhaltsverzeichnis

Einführung in die Thematik	5-18
Publikation: Was können regenerative Materialien in der Zahnmedizin	
leisten – und wo sind die Grenzen?	
Publikationsdissertation	19-28
Publikation: Optimized in vitro procedure for assessing the cytocompatibility	
of magnesium-based biomaterials	
Zusammenfassung und Literaturverzeichnis	29-42
Inhaltliche Zusammenfassung der Publikationsdissertation und Darstellung	
des Kontexts	
Anhang	43-50

R. Smeets<sup>1</sup>, O. Jung<sup>1</sup>, H. Hanken<sup>1</sup>, P. Hartjen<sup>1</sup>, A. Al Dam<sup>1</sup>, A. Gröbe<sup>1</sup>, M. Heiland<sup>1</sup>, M. Gosau<sup>2</sup>, D. Rothamel<sup>3</sup>, M. Schlee<sup>4</sup>, G. Iglhaut<sup>5</sup>, A. Kolk<sup>6</sup>

# Was können regenerative Materialien in der Zahnmedizin leisten – und wo sind die Grenzen?



R. Smeets

*What is achievable with regenerative materials in dentistry – and where are the limits?* 

Einleitung: Der menschliche Knochen kann personenbezogen physiologisch sowie aufgrund verschiedener exogener Einflussfaktoren beispielsweise Krankheiten oder auch degenerativ bedingt nur eingeschränkt in der Lage sein, größere Knochendefekte zu heilen. Dabei kann das regenerative Potenzial des menschlichen Knochens durch verschiedene Gruppen von Knochenersatzmaterialien als Suppositorium in unterschiedlichem Maße unterstützt werden. Material und Methoden: Die heute verfügbaren Materialien können vom Grundsatz her in zwei Gruppen unterteilt werden: natürliche und synthetische Knochenersatzmaterialien (KEM). Die Gruppe der natürlichen KEMs umfasst neben autologen Substanzen auch die der allogenen, xenogenen und phytogenen Materialien. Zu den synthetischen KEMs zählen Metalle, Zemente, Keramiken, Polymere und Komposite. Dabei sind die verschiedenen Produktklassen bereits mehr oder weniger in der alltäglichen Praxis integriert und akzeptiert. Die Vorteile und Risiken der verfügbaren Materialien müssen bekannt sein, um diese bei den entsprechenden Indikationen richtig einsetzen zu können.

**Ergebnisse und Schlussfolgerung:** In diesem Artikel werden neben aktuell verfügbaren zahnmedizinischen regenerativen Materialien auch solche vorgestellt, welche zukünftig vermehrt Zugang in den praktischen Alltag erhalten könnten. Neben der Ausführung von interdisziplinären Anwendungscharakteristiken werden experimentelle wie auch klinische Studien zu den jeweiligen Materialien thematisiert. (Dtsch Zahnärztl Z 2014; 69: 708–721)

Schlüsselwörter: regenerative Materialien; Knochenersatzmaterialien; Knochentransplantate; natürliche Materialien; synthetische Materialien **Introduction:** The regenerative potential of human bone growth is constrained by different factors like individual-related physiology and various other determinants such as disease and age. Thereby, the regenerative potential of human bone can be enhanced by various bone substitute materials as a suppository.

**Material and Methods:** Currently available materials can be divided into two groups: natural and synthetic bone substitute materials (BSM). Beside autogenic substances, the group of natural BSM includes allogeneic, xenogeneic and phytogenic materials. The synthetic group can be divided into metals, cements, ceramics, polymers and composites. The different product categories are more or less accepted and integrated in everyday practice. It is crucial to know the benefits and risks of available materials in order to use them properly for the appropriate indications.

**Results and Conclusion:** In addition to currently available dental regenerative materials, this article introduces further constituents which could increasingly gain access to practice in the nearer future. Besides conducting interdisciplinary application characteristics, the article discusses experimental and clinical studies on the respective materials.

Keywords: regenerative materials; bone substitute materials; bone transplants; natural materials; synthetic materials

DOI 10.3238/dzz.2014.0708-0721

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Universitätsklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, Paracelsus Medizinische Privatuniversität, Nürnberg

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Köln

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Praxis Dr. Markus Schlee, Forchheim

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Zahnarztpraxis Dr. Gerhard Iglhaut, Memmingen

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Technische Universität München-Klinikum rechts der Isar Peer-reviewed article: eingereicht: 04.07.2013, revidierte Fassung akzeptiert: 15.07.2014

## 1. Einleitung

Regenerative Materialien stellen einen Bereich mit erheblichem wirtschaftlichen Potenzial und steigenden Wachstumsraten dar. Nach Umsatzrückgängen in den Jahren 2000 bis 2002 konnte der weltweite Absatz von 487 Millionen Dollar im Jahr 2002 auf 2,4 Milliarden Dollar im Jahr 2007 fast verfünffacht werden [51]. Insgesamt waren 2007 weltweit über 55 kommerziell aktive Firmen sowie über 110 Firmen oder Startups mit über 6.000 Vollzeitarbeitsstellen am Markt vertreten, von denen 55 % ihren Hauptsitz in den USA hatten [51]. Das für 2007 errechnete Gesamtkapital des Sektors in Höhe von 4,7 Milliarden Dollar untermauert dessen wirtschaftliche Relevanz [22, 51].

Viele Defektsituationen nach Knochen- oder Weichgewebeverlust in der Zahnmedizin verlangen aufgrund der limitierten Verfügbarkeit und der gegebenen Entnahmemorbiditäten nach Ersatzgeweben oder wachstumsunterstützenden Materialien verschiedener Herkunft.

Folgende regenerative Materialien können unterschieden werden:

- Knochenersatzmaterialien
- Membranen
- Weichgeweberegenerate

In diesem Artikel werden im Folgenden die großen Wissens- und Themengebiete regenerativer Materialien systematisch beschrieben, erläutert sowie mit relevanten aktuellen Studien aus dem zahnmedizinischen Bereich unterlegt. Aufgeführte Produkte stellen lediglich Beispiele für bestimmte Gruppen regenerativer Materialien dar.

## 2. Grundlagen: Osteogenese, Ossifikation, Defektheilung

Osteogenese (Entstehung eines Knochens) und Ossifikation (Bildung von Knochengewebe) werden bei der Beschreibung der desmalen (direkten) und chondralen (indirekten) Knochenbildung oft synonym verwendet, wobei durch das Zusammenspiel von Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten als "basic multicellular unit" (BMU) neuer Knochen gebildet bzw. im Zuge der Kallusformation erneuert wird [38, 39, 43, 80].

Osteoblasten stammen dabei von sich zu Osteoprogenitorzellen differenzierenden, multipotenten mesenchymalen Stammzellen (MSCs) ab, welche sich durch verschiedene Stimuli, beispielsweise durch Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), eine Metalloprotease aus der Peptidase M12 A Familie und ein wichtiger Ansatzpunkt regenerativer Versuchsreihen, weiter zu Osteoblasten differenzieren [43, 79]. Osteoklasten entstammen hingegen den Granulozyten/Makrophagen-Progenitorzellen und somit den multipotenten hämatopoetischen Stammzellen, welche sich durch Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierende Faktoren (GM-CSF), Makrophagen Kolonie-stimulierende Faktoren (M-CSF), Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) und verschiedene Interleukine differenzieren [43]. Dabei nehmen Osteoblasten bei der Osteoklastogenese eine parakrine Regulierungsfunktion ein, indem sie durch ihren RANKL-Liganden mit dem Transmembranrezeptor RANK mit anschließender NF-KB vermittelten Signaltransduktion die Osteoklastogenese anregen und über den WNT/β-Catenin-Weg mit OPG-Bildung diese Rezeptoren inhibieren [38, 39, 43].

2.1 Knochenersatzmaterialien (Engl: Bone Subsitute Materials [BSMs])

Knochenersatzmaterialien (KEM) werden in natürliche, synthetische und Verbundmaterialien eingeteilt (Tab. 1) [22, 42, 42, 75, 75, 77].

Die aufgeführten Materialien müssen hierbei verschiedenen Ansprüchen gerecht werden und sollten diverse Funktionen erfüllen.

Zurückgehend auf die initialen Versuche durch *Barth* und *Ollier* in den Jahren 1867 und 1893 werden folgende Ansprüche an ein ideales KEM gestellt [30, 42, 66, 77]:

- Sterilität und Biokompatibilität
- Fehlende Toxizität, Teratogenität, Kanzerogenität und Immunogenität
- (Möglichst vollständige) Biodegradierbarkeit
- Osteoinduktion, Osteokonduktion und Osteopromotion
- Stabilisierung des Blutkoagels
- Stabilität bei gleichzeitiger interkonnektierender Porosität
- Frühzeitige Belastbarkeit

- Langfristige, stabile Implantatintegration
- Kostengünstige, dreidimensionale Struktur

Diese Anforderungen werden je nach Produktklasse und Zusammensetzung vornehmlich von Kompositen erfüllt, während Kalziumphosphatzemente, Polymere, Keramiken sowie natürliche Kollagene osteokonduktiv und demineralisiertes Knochenmineral, WF (Wachstumsfaktoren), Zytokine als auch genetische Therapieansätze osteoinduktiv wirken [42, 66, 77].

Die als echte Knochenneogenese bezeichnete Osteokonduktion entlang einer möglichst stabilen Leitschiene unterscheidet sich dabei von der durch WF (z.B. bone morphogenetic proteins, BMPs) vermittelten Osteoinduktion als Induktions- und Differenzierungsvorgang osteogener Zellen aus niedrig differenzierten Vorläuferzellen. Dabei entstehende Osteoprogenitorzellen lassen Knochen in Geweben entstehen, die normalerweise nicht am Knochenstoffwechsel bzw. der Knochenheilung teilnehmen (z.B. Muskel) [22, 42, 77]. Der Begriff der Osteopromotion beschreibt dabei die stimulierenden Wirkungen auf ortsständige osteogene Zellen, was ebenfalls in manchem Ausmaß durch KEMs anteilmäßig gewährleistet werden kann [77]. Interkonnektierende Poren unterschiedlicher Dimension vergrößern die innere Oberfläche des KEMs, wobei zunehmende Porendurchmesser von > 100 µm eine Vaskularisation bei wiederum abnehmender Stabilität ermöglichen. Kleinere Poren fördern die Gewebeformation durch An- und Einwachsungsvorgänge, was wiederum einer Neovaskularisation entgegensteht [77].

Neben Formstabilität und guten biomechanischen Eigenschaften sollten Knochenersatzmaterialien eine anwenderfreundliche Verarbeitung und Handhabung sowie je nach Zielsetzung optimale Resorptionseigenschaften (gleiche Geschwindigkeit von Degradation und nativer Ersatzknochenbildung) aufweisen [42, 77].

In Abhängigkeit von Einsatzgebiet und Zielsetzungen können KEM folgende Funktionen erfüllen:

- Osteokonduktion und -induktion bei Verwendung als Platzhalter und Leitschiene zur Formgebung
- Stimulierung des Knochenstoffwechsels

- Trägermaterial für verschiedene aktive Substanzen, z.B. Antibiotika, WF
- Trägermaterial für gentherapeutische Zielsetzungen

Die Anforderungen und Funktionen werden bezüglich der osteogenen Neuformation von autogenen Transplantaten maximal erfüllt, wohingegen andere Entitäten diese nur teilweise unter Berücksichtigung einer möglichen Trägerfunktion für wachstumsfördernde Ansätze bzw. Substanzen erreichen.

Trotz vieler erfolgsversprechender Ergebnisse und Forschungsansätze im Bereich der KEM muss der autologe Knochentransfer weiterhin als Goldstandard gelten. Autologer Knochen kann bei gleichzeitig guter Biokompatibilität durch die hypoallergene Struktur als osteokonduktives Scaffold mit osteogener Kapazität genutzt werden und sowohl vaskulär als auch avaskulär mit erheblich höheren Erfolgsraten transplantiert werden als momentan verfügbare nichtautologe Knochenersatzmaterialien [33, 42, 77].

## 2.2 Natürliche KEM

Die natürlichen Materialien lassen sich gemäß ihrer Herkunft in autogene (Spender und Empfänger stellen das gleiche Individuum dar), allogene (Spender und Empfänger gehören der gleichen Spezies an) und xenogene (Spender um Empfänger gehören nicht der gleichen Spezies an) Ausgangssubstanzen unterteilen [42]. Phytogene Materialien können hierbei der Gruppe der Xenogene untergeordnet werden.

In der Gruppe der synthetischen Materialien werden Keramiken, Metalle, Polymere sowie Zemente unterschieden.

Verbundmaterialien werden auch als Komposite bezeichnet.

## 2.2.1 Autogene Transplantate

Autogene Materialien werden aus dem eigenen Körper entnommen und an anderer Stelle als Knochentransplantate eingesetzt, wodurch Aufbau und Eigenschaften des Transplantates den Anforderungen an das ideale KEM entsprechen. Trotz begrenzter biologischer Verfügbarkeit und einhergehender Entnahmemorbiditäten gilt das autogene Transplantat weiterhin als Goldstandard zur Augmentation voluminöser Defekte und gehört zu den am häufigsten transplantierten Geweben überhaupt [30, 42, 79]. Dabei vermitteln natürlich verfügbare Stammzellen und WF sowohl osteoinduktive- als auch konduktive Eigenschaften [30, 42, 79, 79].

Es wird zwischen vaskularisierten-, avaskulären- und spongiösen Transplantaten unterschieden, die je nach Indikation unter Verwendung etwaiger Hilfsmittel (Scaffolds, Schrauben u.a.) zum Einsatz kommen.

Osseo Plus Transfer (BEGO, Bremen, Deutschland) ist ein Entnahmesystem für autogene Transplantate zum Einsatz bei horizontalen und vertikalen Knochendefekten, insbesondere des Alveolarkammes. Nach Aufbereitung des Empfängerlagers und Entnahme des Transplantates wird dieses mittels Osteosyntheseschrauben am Zielort befestigt (Abb. 1).

Für großvolumige Knochendefekte wie beispielsweise Teil- oder Komplettresektionen des Unterkiefers können mittels CAD/CAM-Technologie autologe Knochentransplantate (z.B. Fibula, Beckenkamm) mittels Schablone ausgeschnitten und entsprechend der Konfiguration des Empfängerlagers für die Transplantation vorbereitet werden. Derartige Systeme werden unter anderem von den Firmen Depuy-Synthes (Tutlingen, Deutschland), KLS Martin (Tutlingen, Deutschland), Planmeca (Helsinki, Finnland) und BIOMET (Berlin, Deutschland) angeboten.

Als weniger invasiv und damit weniger patientenbelastend gilt das Entnahmesystem von Knochenmarkaspiraten für großvolumige Knochendefekte (Reamer-Irrigator-Aspirator [RIA]- Technik), wobei Knochenmark aus dem Femur aspiriert wird [30, 60]. Bei quantitativ gesteigertem Entnahmematerial zeigen bisherige Ergebnisse keine Nachteile im Vergleich zur herkömmlichen Beckenkammentnahme [8, 28, 60].

## 2.2.2 Allogene Transplantate

Allogene KEM werden aus Organspenderknochen gewonnen und sind nach verschiedenen Aufbereitungsprozessen in vielen Formen verfügbar. Dabei können spongiöse sowie kortikale Substanzen als mineralisierte oder demineralisierte (DBM = *demineralized bone matrix;* DFDBA = *demineralized freeze-dried bone allograft*) Knochenmatrix verwendet werden. Bei beiden Aufbereitungsformen steht eine initiale Entfernung immunogener- und infektiöser Rückstände im Vordergrund, die je nach Hersteller und Produkt durch verschiedene Verfahren erreicht wird (z.B. Lyophilisierung, Gammabestrahlung, Peressigsäure-Ethanol-Sterilisierung). Demineralisierte Materialien bieten durch die gute Verfügbarkeit der nach Aufbereitung noch erhaltenen WF ein höheres induktives Potenzial [22, 34, 42, 72, 77]. Trotzdem kann das Risiko der Übertragung kontaminierter Materialien hierbei mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Maxgraft (botiss dental GmbH, Berlin, Deutschland) ist ein Produktbeispiel für eine mineralisierte Knochenmatrix und wird nach hohen Qualitätsstandards steril aus Organspenderknochen durch die Gewebebank der Universitätsmedizin Charité, Berlin, aufbereitet (Spenderauswahl, Spendertestung auf Infektionen mit HIV, HBV und HCV, chemische Reinigung, Aufbereitung, Sterilisation) (Abb. 2a, b). Human-Spongiosa ist als Granulat oder in Blockform erhältlich. Als weitere Produktbeispiele für eine mineralisierte Knochenmatrix sind die verschiedenen spongiösen und kortiko-spongiösen Produkte Puros (Zimmer Dental, Freiburg, Deutschland) sowie die Präparate des Deutschen Instituts für Zell- und Gewebeersatz zu nennen, welche sich durch ihre Spendergewebe, Herstellungsverfahren, Produktzusammensetzung und Darreichungsform unterscheiden.

Bei DBM werden die anorganischen Bestandteile vollständig entfernt, sodass ein kollagen-trabekuläres Gerüst zurückbleibt. Hierdurch stehen die enthaltenen WF (z.B. knochenmorphogenetische Proteine und Zytokine) in höherem Maße zur Verfügung [22, 34, 77]. Als kommerziell verfügbare Produkte sind hier u.a. Grafton (BioHorizons, Freiburg, Deutschland) und Puros in demineralisierter Form (Zimmer Dental, Freiburg, Deutschland) zu nennen, welche als Putty (Paste), Block oder flexibel schneidbare Streifen erhältlich sind.

Die aus der Maxgraft-Produktfamilie erhältlichen *bonerings* (botiss dental GmbH, Berlin, Deutschland) stellen ebenfalls eine neuartige patientenfreundliche Produktentwicklung dar und werden aus vorfabrizierten Spongiosablöcken hergestellt. Diese können bei Sinusbodenaugmentationen sowie

Materialherkunft	Materialbeschreibung	Wirkung	Nachteile/Vorteile	Beispielpräparate
Natürliche Materialien				
Autolog/autogen (Autoplastik)	Spender und Empfänger gleich	osteokonduktiv (osteoinduktiv)		Tibiapräparat
Syngen/isogen	Spender und Empfänger sind Zwillinge	osteokonduktiv	Übertragung von Infektionskrankheiten möglich	Knochenmark
Allogen (mineralisiert)	Spender und Empfänger gehö- ren der gleichen Spezies an	osteokonduktiv	Übertragung von Infektionskrankheiten möglich	Maxgraft, bonerings (Botiss). Puros mineralized (Zimmer Dental)
Allogen (entmineralisiert)	Spender und Empfänger gehö- ren der gleichen Spezies an	osteokonduktiv	Übertragung von Infektionskrankheiten möglich	G <i>rafton</i> (BioHorizons), Puros demineralized (Zimmer Dental)
Xenogen	Spender gehört einer anderen Art an, z.B. bovines Material	osteokonduktiv	Übertragung von Infektionskrankheiten möglich	Bio-Oss (Geistlich), Cerabone (Botiss), Bego-Oss (BEGO)
Phytogen	Pflanzliches Material	osteokonduktiv	Übertragung von Infektionskrankheiten möglich	<i>Algipore</i> (Dentsply), <i>Biocoral</i> (Biocoral)
Synthetische Materialien			Keine Übertragung von Infektionskrankheiten möglich	
Keramiken	Kalziumphosphat-Keramiken aus reinem Hydroxylapatit	osteokonduktiv		Ostim (Heraeus Kulzer)
Zemente	Kalziumphsophatzemente, bestehend aus ein bis zwei Puderkomponenten in wässriger Lösung	osteokonduktiv		Norijan CRS® (Synthes)
Biologische Gläser	Basierend auf Säureoxid, Kieselerde und Laugen	osteokonduktiv		Biogran <sup>®</sup> (BIOMET)
Polymere (degradierbar)	Synthetisches degradierbares Polymer	osteokonduktiv		PLGA (Poly(lactic-co- glycolic acid)), z.B. <i>Bioseed Oral Bone</i> (BioTissue Technologies)
Polymere (nicht-degradierbar)	Synthetisches nicht- degradierbares Polymer	osteokonduktiv		Polyethylen (PE)
Komposite	Vermischung verschiedener natürlicher und synthetischer Materialien zur Osteokonduktion- und Induktion	osteokonduktiv, osteoinduktiv		Fortoss Vital (Biocomposites)

**Tabelle 1** Verfügbare Knochenersatzmaterialien.

**Table 1** Available bone substitute materials.

horizontalen- und vertikalen Knochendefekten eingesetzt werden und ermöglichen eine simultane Implantatversorgung (Abb. 3).

Als individuelle allogene Transplantatlösung steht das Produkt maxgraft bonebuilder (botiss dental GmbH, Berlin, Deutschland) zur Verfügung, welches durch CT/DVT-Scans mittels CAD/CAM-Technik individuelle, auf den Patienten zugeschnittene Implantate durch die "Cells and Tissuebank Austria (CTBA)" anbietet (Abb. 4).

Nach aktueller Studienlage können demineralisierte allogene KEM bei Sinusbodenaugmentationen gleichwertige Ergebnisse wie autologe Transplantatmaterialien erzielen. Dies konnte auch für Kieferkammaugmentationen, intraossäre Defekte sowie für Implantatversorgungen nachgewiesen werden [2, 16, 17, 27, 29, 40, 56, 61–63, 82, 95]. Einem praktischen Einsatz kann aber das theoretische Risiko einer Übertragung viraler Erkrankungen gegenüber stehen.

2.2.3 Xenogene Transplantate

Das poröse Hydroxylapatit (HA) wird als Hauptbestandteil der meisten xenogenen Materialien verwendet und entspricht dem Hauptbestandteil der anorganischen Knochenmatrix. Die meisten



**Abbildung 1** Beispielgrafik für horizontalen Knochenaufbau [9]. **Figure 1** Example for horizontal bone grafting [9].

xenogenen Materialien werden auf pflanzlicher (Algen, Korallen) oder tierischer Basis (bovin, equin, porcin) in mineralisierter Form mittels Kalzinierung oder Pyrolysierung gefertigt.

Das auf Algen basierende Algipore (Dentsply, Konstanz, Deutschland) als phytogenes HA ist ein knochenanaloges hochporöses Kalziumphosphat, welches zur Auffüllung von Knochendefekten verwendet wird und in Porengrößen von 0,3 bis 2 mm zum Einsatz kommt. Hier kann auch Biocoral (Biocoral, La Garenne Colombes, Frankreich) als kristallines Kalziumkarbonat in Aragonit-Struktur verwendet werden, welches ebenfalls hochporös (250–750 µm Porengröße) angeboten wird.

Das aus bovinem spongiösen HA hergestellte Bio-Oss (Geistlich, Wolhusen, Schweiz) ist das am besten untersuchte KEM und kann neben synthetischen β-Trikalziumphosphat-Produkten und allogenen Transplantaten als evidenzbasiertes KEM für verschiedene Knochendefekte angesehen werden [42, 88]. Durch chemische Reinigung (Entfernung von Fetten, Proteinen und Mikroorganismen) und Sterilisation durch Gamma-Bestrahlung kann das lange Zeit als möglicher "slow virus"-Überträger angesehene Material als überaus sicher eingestuft werden. Der natürliche Aufbau und die Langzeitstabilität von Bio-Oss führen zu einer verlässlichen Knochenneubildung, welche in zahlreichen Studien und Reviews in vitro und in vivo bestätigt wurde [6, 42, 54, 64, 70, 88]. Als osteokonduktives Material kann es neben der Auffüllung von Knochendefekten und bei Sinusaugmentationen auch für periimplantäre Defekte verwendet werden, wobei es zusätzlich zur initialen Stabilisierung des Blutkoagulums führt [77]. Neben Bio-Oss Collagen, welches zusätzlich 10 % Kollagen zur Beschleunigung der Resorptionsprozesse beinhaltet, wird Bio-Oss in Granulat- und Blockform angeboten. Cerabone (botiss dental GmbH, Berlin, Deutschland), Bego Oss (BEGO, Bremen, Deutschland, Abb. 5a, b), CompactBone (Dentegris, Duisburg, Deutschland), NuOss (Henry Schein, Langen, Deutschland) sowie Nu-Oss Collagen (Henry Schein, Langen, Deutschland) stellen einige mit Bio-Oss bzw. Bio-Oss Collagen vergleichbare Produkte mit ähnlichem Indikationsprofil und vergleichbarer Studienlage dar.

Die bovine Hydroxylapatit-Keramik Cerabone ist besonders durch ein spezielles Herstellungsverfahren, in dessen Mittelpunkt die Sicherheit des Materials steht, charakterisiert. In einer zweistufigen Hochtemperatur Prozessierung werden alle organischen Bestandteile sowie antigene und infektiöse Komponenten vollständig entfernt. Durch die Erhitzung auf 1250 °C werden ebenfalls Prionen, die für die Übertragung der bovinen Encephalitis (BSE) verantwortlich sind, sicher eliminiert, jegliches Übertragungsrisiko kann somit ausgeschlossen werden. Der Sinterungsprozess führt außerdem zu einer hohen Kristallinität und Phasenreinheit der resultierenden Hydroxylapatit-Keramik. Beides bedingt eine hohe mechanische Stabilität sowie eine Stabilität des Kristallverbundes, welche ein Herauslösen von Einzelkristallen verhindert, die eine ungewünschte Fremdkörperreaktion auslösen können. Da im Verlauf der Prozessierung die natürliche raue Oberfläche und offenporige Struktur des bovinen Knochens erhalten bleibt, zeigt cerabone gute osteokonduktive Eigenschaften und dient damit als Leitschiene für einwachsende Knochenzellen und Blutgefäße.

Als weitere xenogene Materialien sind u.a. die auf equiner Basis hergestell-

ten Ox (imperiOs, Frankfurt, Deutschland) und Bio-Gen (Mectron, Köln, Deutschland) sowie die auf porciner Grundlage gefertigten Substanzen Osteobiol, Apatos, Gen-Os, MP3, Putty (American Dental Systems, Vaterstetten, Deutschland) und OsteoGraf (Dentsply, Konstanz, Deutschland) verfügbar. Sie unterscheiden sich neben ihrer Ursprungssubstanz (porcin, equin/cortical, spongiös, kortikal-spongiös) auch hinsichtlich Herstellungsverfahren, Anwendungsspektrum und Applikationsform (Putty, granulär, Gel) und können dem etablierten Bio-Oss als gleichwertig angesehen werden [6].

Als demineralisiertes xenogenes Substitutionsprodukt auf Basis eines Kollagenlyophilisats konnten Coloss (Ossacur, Oberstenfeld, Deutschland) sowie das mit Teicoplanin versehende strukturgleiche Targobone (Ossacur, Oberstenfeld, Deutschland) qualitativ gleiche Ergebnisse wie HA/β-TCP-(PDLLA)-Keramiken erzielen, wobei die Ergebnisse gegenüber alloplastischen Transplantaten mechanisch minderwertiger waren [7, 20]. Insgesamt muss im Besonderen bezüglich des Produktes Targobone auf die von der Evidenzlage her unzureichende Studienlage verwiesen werden [71].

PepGen P15 (Dentsply, Konstanz, Deutschland) ist ein innovatives xenogen-synthetisches Produkt aus bovinem HA und synthetischem Polypeptid P-15. Das Polypeptid aus 15 Aminosäuren imitiert den Kollagenbindungsrezeptor für Osteoblasten auf der Knochenoberfläche und führt so zu deren Differenzierung, was eine beschleunigte Knochenneubildungsrate bewirkt. Das in PepGen P15 verwendete HA wird in einem Hochtemperaturverfahren bei 1.100 °C hergestellt und das Polypeptid P-15 anschließend irreversibel gebunden.

## 2.3. Synthetische und artifizielle Materialien

Synthetische Knochenersatzmaterialien können wie folgt unterteilt werden

- Metalle: Titan
- Zemente: Kalziumphosphatzemente
- Keramiken: Hydroxylapatit, α-/β-Trikalziumphosphat (α-/β-TCP), Biogläser
- Glasionomere
- Polymere: Polyglycolide, Polylaktide, Copolymere



Abbildung 2a Ein Beispiel für eine mineralisierte allogene Knochenmatrix in rasterelektronenmikroskopischer Aufnahme (rechts) und makroskopisch in Blockform (links) [14].
Figure 2a Example for a mineralized allogenic bone matrix: scanning electron microscopy (right) and macroscopic in block shape (left) [14].



Abbildung 2b Ein weiteres Beispiel für eine mineralsierte allogene Knochenmatrix in rasterelektronenmikroskopischer Aufnahme (rechts) und makroskopisch in Blockform (links) [14]. Figure 2b Another example for a mineralized allogenic bone matrix: scanning electron microscopy (right) and macroscopic in block shape (left) [14].

• Komposite: Mischverhältnisse organischer und anorganischer Komponenten Das hydroxylierte und von Osteoblasten gebildete Kalziumphosphatsalz HA mit hohem Härtegrad ist der Hauptbestandteil der anorganischen Knochenphase und bildet nach einem Raumgitterprinzip hexagonal-nadelförmige Kristalle. Natürliches HA dient als Vorlage für synthetische HA- und Phosphatkeramiken [43, 77].

Der menschliche Knochen setzt sich aus 25 % organischer Substanz (hauptsächlich Kollagen Typ I), 65 % anorganischer Matrix (HA) sowie 10 % Wasser zusammen, wobei die HA-Kristalle durch Verbindung mit den Kollagenfibrillen Härte- und Knochenfestigkeitsgrad bestimmen [47, 77].

Das weitestgehend mit dem natürlichen HA identische synthetische Keramikprodukt  $\beta$ -TCP mit einem verträglichen CaO-P2O5-Verhältnis von 1,67 geht als osteotrop-bioaktiver Werkstoff mit Freisetzung von Kalzium- und Phosphationen eine so genannte Verbundosteogenese mit dem menschlichem Knochen ein, was neben Stabilität und Osteokonduktion auch dessen Verträglichkeitsprofil unterstreicht [42, 58, 77].

## 2.3.1 Metalle

Reintitan und Titanlegierungen gelten im orofazialen Bereich für knöcherne Defekte und Implantatstrukturen als etablierte temporäre Werkstoffe und sind als Platten, Nägel, Schrauben, Drähte, Klammern und dentale Implantate erhältlich [30, 42, 77]. Im Gegensatz zu Legierungen aus rostfreiem Stahl, Edelstahl und verschiedenen Kobalt-Chrom-Bindungen, ist Titan aufgrund seiner mäßig erhöhten Elastizität und Festigkeit weniger anfällig für osteopenische Prozesse ("stress shielding") gemäß dem Wolff-Gesetz [30, 77].

In der Herstellung der heute kommerziell verfügbaren Titanimplantate gibt es verschiedene Strahlmittel und Verfahren zur Oberflächenmodifikation. Dabei zeigen neueste Studien eine erhöhte Knochenformation und Osseointegration von "grit blasted" und "thermal treated" ("2step") sowie "micro arc oxidized" (MAO) behandelten Titanoberflächen [3, 26, 55]. *Canullo* et al. konnten ebenfalls geringere Knochenverluste in einem Zeitraum von 6 bis 18 Monaten bei in Argon-Plasma behandelten dentalen Titaniumimplantaten feststellen [15].

Zur Optimierung der adhäsiven und integrativen Prozesse konnten Studien Vorteile bei einer Ummantelung von Titan mit HA ("coating") aufzeigen, wobei die HA-Beschichtung selber keinen antibakteriellen Effekt hat [5, 91, 92]. Weiterhin fraglich und durch konträre Studienergebnisse in Frage gestellt ist, ob die Rauheit und Mikroporosität das entscheidende Kriterium für eine gesteigerte Osseointegration darstellt [19, 30].

Bezüglich der Prävention von Implantatverlusten zeigen mit HA beschichtete Implantate mit zunehmender Schichtdicke und Länge von über 10 mm eine gleichmäßigere Verteilung der Kaukraft [18, 25]. Wo Rauchen und Belastungen von nur 150 N den Implantaterfolg gefährden können, konnten Mahnama et al. im Tierversuch die Mechanostat-Theorie nach Frost für eine notwendige Belastung des Kiefers nach Implantatversorgung bestätigen [23, 52, 86]. Als weiteres Forschungsspektrum dentaler Titaniumimplantate darf die Entwicklung einer proliferationsfördernden und gleichzeitig antibakteriellen Oberfläche durch inkorporierte Antibiotika gesehen werden, wobei Polycaprolacton/Alginat (PCL/AL)-Oberflächen und Ringe an der Implantatbasis gute Ergebnisse aufzeigen konnten [35, 45].

Im aktuellen Fokus der Forschung stehen degradierbare Magnesiumimplantate, welche im theoretischen Modell durch optimale Prozesseigenschaften (Einstellen der Rauigkeit, dreidimensionale Kanalstruktur), Stabilität und biologische Eigenschaften (u.a. fehlende Antigenität) überzeugen [81, 94]. Dabei sind aber die Probleme der Degradationskinetik trotz erheblicher Forschungsbemühungen (u.a. H2-Entwicklung, Alkalisierung bei gleichzeitig schneller Degradation) im Wesentlichen bis heute ungelöst [37, 81].

### 2.3.2 Kalziumphosphatzemente

Kalziumphosphatzemente werden in Zwei- und Dreikomponentensysteme unterschieden. Zweikomponentensys-



Abbildung 3 Einsatz eines präfabrizierten allogenen KEM [14].Figure 3 Use of a prefabricated allogeneic bone replacement material [14].



**Abbildung 4** Ein Beispiel für ein durch die CAD/CAM-Technik fabriziertes allogenes KEM [14]. **Figure 4** An example for a CAD/CAM fabricated allogeneic KEM [14].

teme bestehen aus ein bis zwei Kalzium-Pulverkomponenten und Natriummonophosphat als wässriger Lösung, welche als formbare Paste appliziert werden können und durch Sedimentation in situ aushärten ("setting") [11]. Bei Dreikomponentensystemen reagiert ein basisches mit einem sauren Kalziumphosphat unter Bildung eines neutralen Endprodukts.

Wie bei anderen regenerativen Produkten ist auch bei resorbierbaren Kalziumphosphatzementen die Materialporosität für die Osteokonduktion und das Degradationsverhalten entscheidend, wobei die ohnehin nur gering belastbaren Zemente mit zunehmender Porosität weiter an Stabilität einbüßen [11, 73, 77, 78, 84]. *Liu* et al. konnten in diesem Zusammenhang Abhängigkeiten zwischen den Partikelgrößen und Hydradationsvorgängen aufzeigen, was in schnellerer Reaktionsfolge zu Stabilitäten bis 50 MPa führte [49].

Die sich in ihren Einzelkomponenten unterscheidenden Kalziumphosphatzemente Norian CRS (Synthes, Umkirch, Freiburg), BoneSource (Stryker, Duisburg, Deutschland) und CaSO4 (ACE, Brockton, USA) sind einige der am Markt erhältlichen Produkte.

Das aus alpha-Trikalziumphosphat, Monokalziumphosphat-Monohydrat, Kalziumkarbonat und Natriumphosphat bestehende Norian CRS härtet in warmer und feuchter Umgebung innerhalb von 6–8 min zu karbomatisiertem Apatit (Dhallite) aus, was dem humanen Knochenmineral sehr ähnlich ist. Seine Endfestigkeit erreicht Norian CRS nach etwa 12–24 h.

BoneSource härtet als isotherm selbst abbindender Zement bestehend aus Tetrakalziumphosphat, Dikalziumphosphat-Dihydrat und Natriummonophosphat innerhalb von 6-7 min aus und erreicht als HA nach 4-6 h seine Endfestigkeit. Da es aber in wässriger Umgebung zerfällt, gibt es für den mund-, kiefer- und gesichtschirurgischen Bereich klare Zulassungsbeschränkungen.

CaSO4 ist als weiteres Zement aus dieser Produktklasse zu nennen, welches als Kalziumsulfat-Hemihydrat (Gips) bei ähnlichen Aushärtungseigenschaften nach etwa 12 h seine Endfestigkeit erreicht.

## 2.3.3 Keramiken

Die biokompatiblen und osteokonduktiv wirksamen synthetischen Keramiken setzen sich aus den Basissubstanzen HA, alpha-Trikalziumphosphat ( $\alpha$ -TCP) und beta-Trikalziumphosphat ( $\beta$ -TCP) zusammen [10, 21, 73, 77, 83, 85].

Die Keramiken werden mittels Sinterung aus den pulverförmigen Basissubstanzen Kalzium und Phosphor im Verhältnis 1,5 (TCP) bis 1,67 (HA) im Hochtemperaturverfahren bei 1.000-1.500 °C hergestellt, wobei mit höheren Temperaturen die Materialdichte zulasten der Porenanzahl zunimmt [30, 69, 73, 77, 85]. Beide Parameter stellen entscheidende Kriterien für den Substitutionserfolg dar, da eine Porengröße von 150 bis 600 µm eine optimale Grenzflächenaktivität mit Knochenformation gewährleistet und durch die Dichtezusammensetzung der Keramik deren Resorptionsverhalten und Stabilität bestimmt werden, wobei eine höhere Dichte und Stabilität eine schnelle Resorption verhindert [73, 77]. Weiterhin ist festzuhalten, dass HA allein lediglich zellulären Degradationskinetiken ausgesetzt ist, wohingegen von den TCP-Keramiken α-TCP am schnellsten degradiert [30]. Als biphasische Produkte gelten solche, welche in einem bestimmten Mischverhältnis von HA zu TCP zueinander stehen [4, 42, 77].

Ostim (Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland), OsteoGraf LD-300 (Dentsply, Konstanz, Deutschland) und ingeniOs HA (Zimmer Dental, Freiburg, Deutschland) sind Produktbeispiele für reine HA-Keramiken, wobei das nanokristalline Ostim wegen der kleinen Partikelgröße optimal resorbierbar ist und im Gegensatz zu anderen Materialien eine größere spezifische Oberfläche durch Nicht-Sinterung bietet (Abb. 6a-c) [36]. IngeniOs gewährt mit bis zu 80 % interkonnektierender Porosität gute Voraussetzungen für eine optimale und schnelle Knochenneubildung. Die Produkte sind als Granulat und als spritzfertiges Material verfügbar. Ein weiteres Material, das in injizierbarer Form erhältlich ist, ist die synthetische Knochenpaste maxresorb inject (botiss, dental GmbH, Berlin, Deutschland). Es handelt sich ähnlich Ostim um ein Gel aus nanokristallinem Hydroxylapatit, allerdings resultiert die zusätzliche Einlagerung von biphasischen HA/β-TCP Granula in einer erhöhten Volumenstabilität des Materials. Während die nano-HA Partikel sehr schnell resorbieren und die Knochenneubildung stimulieren, dienen die Granula dem Volumenerhalt und bedingen die pastöse Form; maxresorb inject lässt sich formen und an die Defektkonturen anpassen.



**Abbildung 5a** Auflichtmikroskopie (links) und Rasterelektronenmikroskopie (rechts) eines bovinen xenogenen Transplantats [24].

**Figure 5a** Light microscopy (left) and scanning electron microscopy (right) of a bovine xenograft [24].



**Abbildung 5b** Weitere rasterelektronenmikroskopische Bilder eines bovinen xenogenen Transplantats [9, 24].

Figure 5b Further scanning electron microscope images of a bovine xenograft [9, 24].

Als nicht resorbierendes HA für besondere Indikationsstellungen ist u.a. OsteoGraf D (Dentsply, Konstanz, Deutschland) auf dem Markt erhältlich.

Als Mischung aus HA, Kollagen und Chondroitin als Stützgerüst konnte Biosite (Pierre Rolland, Mérignac Cedex, Frankreich) im Vergleich mit reinem HA bessere Ergebnisse bezüglich Zellwachstum, Zelladhäsion und Zelldifferenzierung ostoblastärer Zelllinien aufzeigen [90]. Diese Effekte konnten in Gegenwart humaner mesenchymaler Stammzellen nicht nachgewiesen werden [53].

Maxresorb (botiss dental GmbH, Berlin, Deutschland), CompactBone S (Dentegris, Duisburg, Deutschland) und Straumann BoneCeramic (Straumann, Freiburg, Deutschland) sind weitere zu 100 % synthetische Produkte, setzen sich aber zu 60 % aus langsam resorbierendem HA sowie zu 40 % aus  $\beta$ -TCP zusammen, was in Form von zwei unterschiedlichen Aktivitätsphasen ein optimales Verhältnis von Stabilität und Knochenneubildung gewährleistet. Alle Produkte bieten eine interkonnektierende Porenstruktur und sind ebenfalls in Granulatform, als Spritzapplikation oder teilweise in Block- und Zylinderform verfügbar, wobei maxresorb mit bis zu 80 % Porosität und Porendurchmessern von 200–800 µm optimale Eigenschaften aufweist.

Als reine TCP sind u.a. das  $\alpha$ -TCP Biobase (ImperiOs, Frankfurt, Deutschland) und das beta-Trikalziumphosphat Cerasorb (Riemser, Kleinostheim, Deutschland) verfügbar, welche durch mononukleäre Phagozyten, multinukleäre osteoklastenähnliche Zellen sowie durch chemische Lösungsprozesse degradiert werden [42].

Biobase hat dabei mit 6-24 Monaten ein variabel längeres Degradationsverhalten als  $\beta$ -TCP mit 6-12 Monaten und wandelt sich zum Teil am Implantationsort in Hydroxylapatit um, welches wiederum die lange Nachweisbarkeit in Röntgenbildgebungsverfahren erklärt [93].

β-TCPs wie Cerasorb degradieren teilweise bei Entzündungsvorgängen mit einhergehendem schnellen Volumenverlust bzw. Zerfall [30, 42, 77]. Dagegen bietet das interkonnektierende Mikroporensystem mit Porengrößen

von 0,5 - 0,6 mm eine optimierte Versorgungsumgebung für die sich formierenden und einwachsenden Osteone und Knochenstrukturen (Nerven, Blutgefäße, Fasern), sodass hier von einem β-TCP-Leitschieneneffekt gesprochen werden kann [77, 93]. Cerasorb selbst ist in vier verschiedenen Produktlinien erhältlich: Cerasorb Classic, M, Perio und Plus. Cerasorb M bietet dabei ein mehr mikro-, meso- und makroporöses System zur besseren Knochenformation, wohingegen Cerasorb Plus mit autologen Knochen gemischt implantiert wird. Cerasorb Perio ist speziell für parodontale Defekte entwickelt worden.

Durch seine Gewebeneutralität bildet  $\beta$ -TCP eine hervorragende Grundlage als Scaffold in Kombination mit WF oder auch für die Technik des selective laser meltings [48]. Bei Letzterem wird auf der Basis eines CT Datensatzes ein dem humanen Knochen sehr ähnliches interkonnektierendes Konstrukt hergestellt, welches aus verschiedenen Materialien wie  $\beta$ -TCP und PDLLA die Vorteile der jeweiligen Knochenersatzmaterialien vereint.

In einem systematischen Review zu 5-Jahres-Überlebens- und Komplikationsraten von fixierten dentalen Implantaten, welche entweder durch Keramiken oder mit Metall verstärkten Keramiken fixiert wurden, konnte *Layton* durchgängig schlechtere Ergebnisse für die nur mit Keramiken fixierten Implantate feststellen [46].

### 2.3.4 Biogläser

Konventionelle Biogläser und Glaskeramiken setzen sich aus sauren (Phosphorpentoxid, Siliziumoxid, Aluminiumoxid) und basischen Oxiden (z.B. Kalziumoxid, Magnesiumoxid, Zinkoxid) zusammen. Bei 1.500 °C werden die sauren Ausgangsstoffe gemischt und geschmolzen, wobei sich die basischen Ionen an das entstandene dreidimensionale bioaktive sowie interkonnektiv-poröse Phosphoroxid-Siliziumoxid-Netzwerk anlagern [73, 77]. In situ wird die karbonatreiche Apatitschicht abgeschieden, was im Vergleich zu HA zu einer erhöhten Bioaktivität mit Gewebeformation führt [30, 32, 67, 77]. Das relative neue Sol-Gel-Verfahren verspricht durch Bildung silikatbasierter Hydro- und Xerogele zukünftig neue Applikationsformen mit verstärkten katalytischen Effekten auf die Knochenbildung [30].



**Abbildung 6a–c** Histologische Aufnahmen (links: 35x-Vergrößerung, mittig: 350x-Vergrößerung, rechts: 700x-Vergrößerung) des Knochenformationsprozesses einer reinen Hydroxylapatitkeramik drei Jahre nach Sinuslift. Geflechtknochen (Pfeile) + Osteoidsaum, Ostim-Depot (weißer Stern), Osteo-zytenlakunen (schwarzer Stern).

Figure 6a-cHistological images (left: 35x-magnification, centered: 350x-magnification, right: 700x-magnification) of the bone formation processof a pure hydroxylapatite ceramic bone replacement material three years after sinus augmentation. Woven bone (arrows) + osteoid, Ostim (white<br/>star), osteocyte lacunae (black star).(Abb. 6a-c: R. Smeets)

Als biodegradierbare Bioglas-Produkte sind u.a. Biogran (Biomet, Berlin, Deutschland), PerioGlas (NovaBone, Jacksonville, USA) und NovaBone (ACE, Brockton, USA), welche sich in ihren Mischsubstanzen unterscheiden, in Partikel- oder Blockform verfügbar. Das aus den Basissubstanzen Siliziumoxid und Phosphorpentoxid bestehende Biogran erreicht eine Osteokonduktion dadurch, dass nach phagozytotischem Abbau des Siliziumkerns Osteoprogenitorzellen in die zurückbleibende Phosphoroxidkammer einwachsen können und eine Knochenformation so von Kammer zu Kammer stattfinden kann.

Die relativ schlechte Stabilität der verfügbaren Biogläser verhindert allerdings ihre breite Anwendung in der Zahnheilkunde [30, 77].

## 2.3.5 Polymere

Polymere und Copolymere sind aus einheitlichen oder verschiedenen Monomereinheiten zusammengesetzte Moleküle, die in der Chirurgie vornehmlich als resorbierbare aber auch als nicht resorbierbare Materialien zum Einsatz kommen und aufgrund ihrer relativ geringen Steifigkeit zu einer stärkeren mechanischen Beanspruchung des Knochens führen [22, 31, 42, 76, 77]. Somit kommen sie nur im begrenzten Umfang bei lasttragenden Indikationen zum Einsatz.

Dabei können verschiedene Polymerstrukturen durch ihre Resorptionseigenschaften als "drug-delivery-system" eingesetzt werden, wobei allgemein erhöhte Entzündungsinzidenzen durch freiwerdende Monomereinheiten keine Seltenheit sind [30, 41, 77].

Aus Polymeren bestehende Materialien werden in der Zahn- und Kieferchirurgie als Nahtmaterial, Schrauben und Stifte verwendet, wobei sich ihr Einsatz als Knochenersatzmaterialien noch in der Entwicklungsphase befindet.

So ist das bei Nahtmaterial oft verwendete Polyethylen ein nicht-resorbierbares Polymer.

PLLA (Polylactide), PDO (Polydioxanon) und PLLA-co-DLLA als degradierbare Polymere werden bei verschiedenen Schrauben und Stiften wie Smart Pins, SmartScrew, SmartTrack (PLLA von Bionx, Blue Bell, USA), Orthosorb Pin (PDO von Johnson & Johnson, Neuss, Deutschland) sowie Polypin (PLLA-co-PDLA von Zimmer Dental, Freiburg, Deutschland) verwendet.

Bei den Knochenersatzmaterialien werden Homo- und Copolymere wie PGA (Polyglycolid), PLLA (Poly-L-Lactid), PDLLA (Poly-D,L-Lactid) und PLGA (Poly(lactid-co-glykolid)) verwendet, wobei beim Heteropolymer PLGA aus Milchsäure (LA) und Glycolsäure (GA) ein höherer Anteil an Milchsäure zu einer längeren Degradationszeit führt [41, 42, 44, 77]. Die zur Gruppe der Polyester, Polycarbonate und Polyanhydride gehörenden Materialien werden unterschiedlich resorbiert. So resorbieren Polyester nach Wasserdiffusion als ganzes Material (BULK-Degradation), während mit Dimeren ungesättigter Fettsäuren (FAD) ergänzte Polyanhydride aus Sebacinsäure erst an der Oberfläche degradieren (surface erosion) [13, 44, 77]. Allerdings kommt es beim Einsatz von Polymeren als Knochenersatzmaterialien insgesamt häufig zu entzündlichen Reaktionen unklarer Genese [12, 13].

Als kommerziell verfügbares Produkt ist hier u.a. Bioseed Oral Bone (Fa. BioTissue Technologies, Freiburg. Deutschland) zu nennen, welches als bioresorbierbares Scaffold mit autogenen Knochenzellen des Periost auf Vicrylbasis für etwa zwei Wochen im Labor kultiviert sowie anschließend mit zentrifugiertem Blutserum des Patienten ("Platelet Rich Plasma"-Methode) implantiert wird. In einer Studie von Trautvetter et al. führte Bioseed Oral Bone bei Sinusaugmentationen mit gleichzeitiger Implantatversorgung zu zufriedenstellenden Ergebnissen mit trabekulärer Knochenbildung nach 6 Monaten [89].

## 2.3.6 Komposite

Komposite sind Materialien, welche sich per definitionem aus heterogenen Einzelsubstanzen unterschiedlicher Herkunft zusammensetzen [30, 77, 78]. Es können organische und anorganische Komponenten als rein organische, rein anorganische oder gemischte Kompositionen hergestellt werden. Dabei sind in der Zahn- und Kieferchirurgie insbesondere rein anorganische Komposite auf Basis von Silikaten und HA bedeutsam und können als Trägermaterial, gekoppelt mit Zellen und Proteinen, osteokonduktive sowie osteoinduktive Eigenschaften entwickeln.



**Abbildung 7** Ein Beispiel für eine porcine Kollagenmembran (links: makroskopische Aufnahme, rechts: rasterelektronenmikroskopische Aufnahme) [24].

**Figure 7** An example of a porcine collagen membrane (left: macroscopic image, right: scanning electron image) [24].



Abbildung 8 Beispiel für eine kollagene Membran auf Perikardbasis in makroskopischer (links) und rasterelektronenmikroskopischer (rechts) Darstellung [14].
 Figure 8 Example of a porcine pericardium collagen membrane in macroscopic (left) and scanning electron microscopic (right) recording [14].

Das aus 76 % HA und 24 % Siliziumoxid (SiO<sub>2</sub>) bestehende NanoBone (Artoss, Rostock, Deutschland) wird im Gegensatz zu den meisten Keramiken nicht durch Sinterungsprozesse, sondern im Sol-Gel-Verfahren hergestellt, und gewährleistet durch das enthaltene SiO, ein optimiertes Knochenremodelling [42]. Der hohe Porositätsgrad unterstützt dabei eine relativ hohe mechanische Bruchfestigkeit von 40 MPa [42, 77]. So konnten Abshagen et al. nach 5 Wochen trabekuläre Knochenneubildungen und nach 8 Monaten eine vollständige Resorption von NanoBone aufzeigen [1, 77].

Fortoss Vital (Biocomposites, Staffordshire, England) ist ein ebenfalls vollsynthetisches, osteokonduktives, degradierbares Komposit, welches biphasisch aus Kalziumphosphat und -sulfat besteht. Es wird während der Resorption makroporös und zieht Zellen und interstitielle Flüssigkeit an und stellt so sich ablösende Partikel den Osteoblasten zum Umbau im Rahmen der Knochenneubildung zur Verfügung [74].

Das für kleine Knochendefekte verwendbare easy-graft (Degradable Solutions, Schlieren, Schweiz) ist ein aus  $\beta$ -TCP und BioLinker bestehendes Zweikomponentensystem, welches nach dem Anmischen als Paste und Applizierung innerhalb von wenigen Minuten aushärtet. Das Produkt wird nach etwa 9–15 Monaten vollständig resorbiert und durch neuen Knochen ersetzt [77]. Für größere Defekte steht easy-graft Crystal (Fa. Degradable solutions, Schlieren, Schweiz) aus 60 % Hydroxylapatit und 40 %  $\beta$ -TCP zur Verfügung, wobei es nach Herstellerangaben nicht vollständig resorbierbar ist.

Als weitere Materialien sind u.a. Perossal (botiss dental GmbH, Berlin, Deutschland) aus nanokristallinem HA und Kalziumsulfat sowie ingeni $Os \beta$ -TCP (Zimmer Dental, Freiburg, Deutschland) mit Siliziumbeimischung erhältlich.

## 2.4. Guided Tissue Regeneration (GTR), Guided Bone Regeneration (GBR), Membranen

Das Prinzip der gesteuerten Knochenund Geweberegeneration beruht auf der Platzierung einer Barrieremembran, um langsam-proliferierende Zelltypen wie Osteoblasten und parodontale Zellen von schnell-proliferierenden Epithelund Bindegewebszellen zu trennen und so eine vorhersagbare Regeneration des verloren gegangenen Gewebes zu ermöglichen [80].

Es wird zwischen resorbierbaren und nicht-resorbierbaren Membranen unterschiedlichen Ursprungs (natürlich, synthetisch) unterschieden. Dabei sind als nicht-resorbierbare Produkte synthetischen Ursprungs u.a. Barrier Membrane PTFE (ACE/Fa. Henry Schein Dental GmbH, Langen, Deutschland), Frios BoneShield (Dentsply, Konstanz, Deutschland), Cytoplast TI-250 Membran (Sybron, Bremen, Deutschland) erhältlich.

Heutzutage werden am häufigsten auf Kollagen basierende Barrieremembranen verwendet. In Abhängigkeit von ihrem Ursprung und der Prozessierung zeigen diese Kollagenprodukte unterschiedliche Anwendungs- und Degradationseigenschaften.

Einfache Kollagenkegel oder -schwämme, die aus einer Kollagensuspension hergestellt werden, weisen zwar aufgrund ihrer schnellen Resorption nur eine sehr geringe Barrierefunktion auf, dienen jedoch als natürliches Hämostyptikum sowie der Stabilisierung des Blutkoagulums und der Unterstützung der Wundheilung z.B. in Extraktionsalveolen oder Entnahmestellen. Auf dem Markt erhältliche Produkte sind u.a. Collacone (botiss Dental GmbH, Berlin, Deutschland), CollaPlug (Zimmer Dental, Freiburg, Deutschland), BoneProtect Cone (Dentegris, Duisburg, Deutschland), Jason Fleece (botiss dental GmbH, Berlin, Deutschland), Collagen Fleece (Bego, Bremen, Deutschland), BoneProtect Fleece (Dentegris, Duisburg, Deutschland). Für die Anwendung in GBR und GTR sollten Kollagenmembranen eine Barrierezeit von mindestens 2-3 Monaten aufweisen.

Das auf porciner Kollagenbasis hergestellte Bio-Gide (Geistlich, Wolhusen, Schweiz) zählt zu den bekanntesten und etabliertesten Membranen und wird in chemischen Reinigungsprozessen von Fetten, Proteinen und Mikroorganismen befreit sowie durch Gamma-Bestrahlung sterilisiert (Abb. 7). Interessanterweise wurde kürzlich gezeigt, dass durch Zugabe von alkalischer Phosphatase oder Nikotin in geringen Konzentrationen (0,3 bis 3  $\mu$ g/ml) die konduktiven Eigenschaften von Bio-Gide, insbesondere in der parodontalen Therapie, gesteigert werden konnten [64, 65].





Abbildung 9a Eine Membran für den Ersatz von Weichgewebe (links: makroskopische Aufnahme, rechts: rasterelektronenmikroskopische Aufnahme) [14]. Figure 9a A membrane for the replacement of soft tissue (left: macroscopic image, right: scanning electron image) [14].

Das ebenfalls auf porciner Basis durch das patentierte Tutoplast-Herstellungsverfahren aufbereitete Tutodent (Zimmer Dental, Freiburg, Deutschland) kann hier als alternatives Produkt verwendet werden. Eine weitere Membran mit einer vergleichbaren Barrierezeit von ca. 2-3 Monaten ist die aus porciner Dermis gewonnene collprotect membrane (botiss dental GmbH, Berlin, Deutschland).

Im Gegensatz dazu zeigen Perikardmembranen aufgrund ihrer natürlichen, speziellen Kollagenstruktur eine verlangsamte Degradation und damit eine längere Barrierefunktion (Abb. 8). Die Jason membrane (botiss dental GmbH, Berlin, Deutschland) wird aus porcinem Perikard hergestellt und weist aufgrund eines sehr hohen Anteils an Kollagen Typ-III eine besondere Reißund Zugfestigkeit auf. Nach Herstellerangaben konnte für die Membran im Rahmen von tierexperimentellen Versuchen eine wesentlich verlängerte Barrierefunktion nachgewiesen werden. Weitere vergleichbare Membranen mit einer verlängerten Barrierefunktion sind die BEGO Collagen Membrane (BEGO, Bremen, Deutschland), BoneProtect Membrane (Dentegris, Duisburg, Deutschland), CopiOs Pericardium und Puros





Abbildung 9b Eine weitere Membran für den Ersatz von Weichgewebe (links: makroskopische Aufnahme, rechts: rasterelektronenmikroskopische Aufnahme) [24].

Figure 9b Another membrane for the replacement of soft tissue (left: macroscopic image, right: scanning electron image) [24].

Pericardium (Zimmer Dental, Freiburg, Deutschland).

Als eines der wenigen allogenen Membranprodukte ist PerioDerm (Dentsply, Konstanz, Deutschland) verfügbar, das sich nach Entfernung dermaler- und epidermaler Zelllinien ausschließlich aus extrazellulärer Matrix zusammensetzt.

Neben diversen bovinen- und equinen Produkten stellt das Produkt Zimmer curV (Zimmer Dental, Freiburg, Deutschland) aus bovinem Typ-I-Kollagen eine formbare, aber dennoch resorbierbare Biomembran dar. Hierdurch können Augmentationsmaterialien verschiedener Entitäten und Applikationsspektren optimal vor frühzeitiger Resorption geschützt werden. Als weiteres Produkt aus bovinem Kollagen ist Bio-Mend Extend (Zimmer Dental, Freiburg, Deutschland) zu nennen, welches im Gegensatz zu anderen Membranprodukten Resorptionszeiten von bis zu 18 Wochen angibt.

Verfügbare synthetische Membranen aus der OsteoShield-Produktreihe (Dentsply, Konstanz, Deutschland) sind wegen ihrer nicht-absorbierenden Eigenschaften besonderen Indikationsstellungen vorbehalten, wobei Versuche von resorbierbaren synthetischen Kompositmaterialien aus Chitosan mit Glas-Nanopartikeln gekoppelt vielversprechende In-vitro-Ergebnisse bei guter zellmetabolischer Aktivität und Knochenmineralisation aufzeigen konnten [50, 57].

## 2.5 Weichgewebeersatz

Im Hinblick auf die Entnahmemorbidität ist in der parodontalen Therapie eine Alternative zum herkömmlichen autologen gingivalen Gewebeersatz wünschenswert. Hierbei stehen allogene sowie xenogene Materialien auf boviner und porciner Kollagenbasis zur Verfügung, welche eine schnelle Einheilung und Revaskularisierung gewährleisten.

Die porcinen Produkte wie Mucograft (Geistlich, Wolhusen, Schweiz), Mucoderm (botiss dental GmbH, Berlin, Deutschland) und MucoMatrixX (Dentegris, Duisburg, Deutschland) werden dabei in einem mehrstufigen Reinigungsprozess sicher aufbereitet und sterilisiert (Abb. 9a, b).

Für das auf porciner Basis hergestellte Mucograft (Geistlich, Wolhusen, Schweiz) konnte im Vergleich zu autologen gingivalen Transplantaten sowie zur spontanen Wundheilung sowohl eine signifikante Zunahme keratinisierter Gingiva als auch allgemein gesteigerte Wundheilungseigenschaften bei ästhetisch ansprechenderen Ergebnissen durch weniger Wundranddehiszenzen gezeigt werden [59, 87].

Insgesamt sind Mucograft bzw. porcine Weichgewebetransplantate und allogene Produkte wie die azelluläre Matrix AlloDerm (LifeCell, Wiesbaden, Deutschland) als gleichwertig anzusehen [68].

## 3. Schlussfolgerung und Fazit für die Praxis

Vor allem im zahnmedizinischen und kieferchirurgischen Bereich nehmen Knochen- und Gewebeersatzverfahren eine immer bedeutendere Position ein.

Neben autologen Materialien konnten in mehreren Studien allogene

und xenogene KEM insgesamt gleichwertige Ergebnisse erzielen. Somit muss das KEM unter Beachtung der spezifischen Vor- und Nachteile fallbezogen abgewogen werden, da alle genannten Materialien unterschiedlich ausgeprägt sowohl induktive wie auch konduktive Formationsprozesse antreiben können. Ist beispielsweise ein autologes Transplantat ohne größere Entnahmemorbidität verfügbar, sollte dieses körperfremden Materialien vorgezogen werden. Die mögliche Übertragung von "slow virus"-Erkrankungen durch den Einsatz von allogenen und xenogenen Materialien kann heutzutage als nur noch theoretisch betrachtet werden.

Insbesondere im Bereich synthetischer KEMs konnten große Fortschritte erzielt und ein enormes Entwicklungspotenzial aufgezeigt werden. So sind synthetische Materialien in ihrem Herstellungsprozess unabhängig vom Spendergewebe und können beliebig vervielfältigt und zweckbezogen entwickelt werden. Außer Metallen sind synthetische KEM allerdings nur wenig belastungsstabil und weisen teilweise variable Degradationsmuster mit Entzündungsformationen auf. Trotz bereits vielversprechender In-vivo-Testergebnisse müssen synthetische Materialien in ihrer Funktion des Knochenersatzes den natürlichen KEM nachgestellt werden, wobei sie für spezielle Indikationen bzw. Fälle sogar zum Teil präferiert werden können (z.B. Sinusbodenlift).

Im Rahmen des GTR und GBR können xenogene Membranen, allen voran porcinen Ursprungs, vorgezogen werden. Dabei zeigten sich in verschiedenen Studien jeweils gute konduktive Eigenschaften der Membranen, deren Insitu-Ergebnisse auch aufgrund der geringen Stabilität stark vom Anwender abhängig sein können.

Es ist von einer künftig weiter zunehmenden wirtschaftlichen und praktischen Bedeutung sämtlicher regenerativer Materialien allgemein und im speziellen im großen Feld der Zahnmedizin auszugehen. **Interessenkonflikt:** R. *Smeets* gibt an, drittmittelgeförderte Forschungsprojekte mit den Firmen BEGO Implant Systems GmbH & Co. KG, CAMLOG Vertriebs GmbH, botiss dental GmbH und Heraeus Kulzer GmbH durchgeführt zu haben oder noch aktuell zu bearbeiten.

**Erklärung zur Unabhängigkeit der Autoren:** Die Autoren bedanken sich bei den Firmen BEGO Implant Systems GmbH & Co. KG (Abb. 1 u. 5b), , botiss dental GmbH (Abb. 2a, 2b, 3, 4, 8, 9a) und Geistlich Biomaterials (Abb. 5a, 5b, 7, 9b) für das zur Verfügung gestellte Bildmaterial.

### Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Dr. Ralf Smeets Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Martinistraße 52 20246 Hamburg r.smeets@uke.de

## Literatur

- Abshagen K, Schrodi I, Gerber T, Vollmar B: In vivo analysis of biocompatibility and vascularization of the synthetic bone grafting substitute Nano-Bone. J Biomed Mater Res A 2009;91: 557–566
- Acocella A, Bertolai R, Ellis E, Nissan J, Sacco R: Maxillary alveolar ridge reconstruction with monocortical fresh-frozen bone blocks: a clinical, histological and histomorphometric study. J Craniomaxillofac Surg 2012;40:525–533
- Aparicio C, Padrós A, Gil F: In vivo evaluation of micro-rough and bioactive titanium dental implants using histometry and pull-out tests. J Mech Behav Biomed Mater 2011;4:1672–1682
- Arinzeh TL, Tran T, Mcalary J, Daculsi G: A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. Biomaterials 2005;26: 3631–3638
- 5. Asoda S, Arita T, Takakuda K: Mechanical attachment of soft tissue to dental and maxillofacial implants with mesh structures: An experiment in percutaneous model. J Biomed Mater Res 2013; 101:553–559
- Ayobian-Markazi N, Fourootan T, Kharazifar MJ: Comparison of cell viability and morphology of a human osteoblast-like cell line (SaOS-2) seeded on various bone substitute materials: An

in vitro study. Dent Res J (Isfahan) 2012;9:86–92

- 7. Baas J, Jakobsen T, Elmengaard B, Bechtold JE, Soballe K: The effect of adding an equine bone matrix protein lyophilisate on fixation and osseointegration of HA-coated Ti implants. J Biomed Mater Res 2012;100:188–194
- Beck A, Nehrbass D, Stoddart MJ et al.: The use of Reamer Irrigator Aspirator (RIA) autograft harvest in the treatment of critical-sized iliac wing defects in sheep: Investigation of dexamethasone and beta-tricalcium phosphate augmentation. Bone 2013;53:554–565
- 9. BEGO: BEGO Dental. URL:http://www. bego.com/de/home/. [letzter Zugriff: 09.06.2014]
- Bohner M: Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. Injury 2000;31: 37–47
- Bohner M, Tadier S, van Garderen N, Gasparo A de, Döbelin N, Baroud G: Synthesis of spherical calcium phosphate particles for dental and orthopedic applications. Biomatter 2012;3: e25103
- Böstman OM, Pihlajamäki HK: Adverse tissue reactions to bioabsorbable fixation devices. Clin Orthop Relat Res 2000: 216–227
- 13. Böstman OM, Pihlajamäki HK, Partio EK, Rokkanen PU: Clinical biocompati-

bility and degradation of polylevolactide screws in the ankle. Clin Orthop Relat Res 1995:101–109

- 14. botiss biomaterials: products. URL: https://www.botiss.com/. [letzter-Zugriff: 09.06.2014]
- Canullo L, Götz W: Peri-implant hard tissue response to glow-discharged abutments: Prospective study. Preliminary radiological results. Ann Anat 2012;194:529–532
- Chaushu G, Mardinger O, Calderon S, Moses O, Nissan J: The use of cancellous block allograft for sinus floor augmentation with simultaneous implant placement in the posterior atrophic maxilla. J Periodontol 2009;80:422–428
- Chaushu G, Vered M, Mardinger O, Nissan J: Histomorphometric analysis after maxillary sinus floor augmentation using cancellous bone-block allograft. J Periodontol 2010;81:1147–1152
- Cheng H, Chu K, Shen F, Pan Y, Chou H, Ou K: Stress effect on bone remodeling and osseointegration on dental implant with novel nano/microporous surface functionalization. J Biomed Mater Res 2013;101:1158–1164
- Colombo JS, Satoshi S, Okazaki J, Crean SJ, Sloan AJ, Waddington RJ: In vivo monitoring of the bone healing process around different titanium alloy implant surfaces placed into fresh extraction sockets. J Dent 2012;40:338–346

- 20. Ding M, Røjskjaer J, Cheng L, Theilgaard N, Overgaard S: The effects of a novelreinforced bone substitute and CollossE on bone defect healing in sheep. J Biomed Mater Res 2012;100:1826–1835
- 21. Eggli PS, Müller W, Schenk RK: Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. Clin Orthop Relat Res 1988:127–138
- Fischer J, Kolk A, Wolfart S et al.: Future of local bone regeneration – Protein versus gene therapy. J Craniomaxillofac Surg 2011;39:54–64
- 23. Flanagan D, Ilies H, Lasko B, Stack J: Force and movement of non-osseointegrated implants: an in vitro study. J Oral Implantol 2009;35:270–276
- 24. Geistlich Biomaterials: Products. URL: http://www.geistlich.ch/index.cfm? dom=2&rub=42&id=110579. [letzter Zugriff: 09.06.2014]
- 25. Georgiopoulos B, Kalioras K, Provatidis C, Manda M, Koidis P: The effects of implant length and diameter prior to and after osseointegration: a 2-D finite element analysis. J Oral Implantol 2007;33:243–256
- 26. Gil FJ, Manzanares N, Badet A, Aparicio C, Ginebra M: Biomimetic treatment on dental implants for short-term bone regeneration. Clin Oral Invest (2013). DOI: 10.1007/s00784–013–0953-z
- 27. Guerrero JS, Al-Jandan BA: Allograft for maxillary sinus floor augmentation: a retrospective study of 90 cases. Implant Dent 2012;21:136–140
- 28. Hacking SA: Toward a new standard in autogenous bone graft? Commentary on an article by H. Claude Sagi MD et al.: "Qualitative and quantitative differences between bone graft obtained from the medullary canal (with a Reamer/Irrigator/Aspirator) and the iliac crest of the same patient". J Bone Joint Surg Am 2012;94:e1801–2
- 29. Hawthorne AC, Xavier SP, Okamoto R, Salvador SL, Antunes AA, Salata LA: Immunohistochemical, tomographic, and histological study on onlay bone graft remodeling. Part III: allografts. Clin Oral Implants Res 2013;24:1164–1172
- Heinemann S, Gelinsky M, Worch H, Hanke T: Resorbierbare Knochenersatzmaterialien. Orthopäde 2011;40:761–773
- Hing KA, Annaz B, Saeed S, Revell PA, Buckland T: Microporosity enhances bioactivity of synthetic bone graft substitutes. J Mater Sci Mater Med 2005; 16:467–475
- Hofmann GO: Biodegradable implants in orthopaedic surgery – a review on the state-of-the-art. Clin Mater 1992; 10:75–80
- Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E, Lee D: Role of bone substitutes. Clin Orthop Relat Res 1996:55–65

- 34. Ho SKC, Peel SAF, Hu ZM, Sándor GKB, Clokie CML: Augmentation of the maxillary sinus: comparison of bioimplants containing bone morphogenetic protein and autogenous bone in a rabbit model. J Can Dent Assoc 2010; 76:a108
- 35. Hou J, Li C, Cheng L, Guo S, Zhang Y, Tang T: Study on hydrophilic 5-fluorouracil release from hydrophobic poly(å-caprolactone) cylindrical implants. Drug Dev Ind Pharm (Drug Development and Industrial Pharmacy) 2011;37:1068–1075
- 36. Huber F, McArthur N, Heimann L et al.: Evaluation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite paste Ostim in comparison to Alpha-BSM – more bone ingrowth inside the implanted material with Ostim compared to Alpha BSM. BMC Musculoskelet Disord 2009;10:164
- 37. Kirkland NT, Birbilis N, Staiger MP: Assessing the corrosion of biodegradable magnesium implants: a critical review of current methodologies and their limitations. Acta Biomater 2012;8: 925–936
- 38. Koch FP, Wunsch A, Merkel C et al.: The influence of bisphosphonates on human osteoblast migration and integrin aVb3/tenascin C gene expression in vitro. Head Face Med 2011;7:4
- 39. Koch FP, Yekta SS, Merkel C, Ziebart T, Smeets R: The impact of bisphosphonates on the osteoblast proliferation and Collagen gene expression in vitro. Head Face Med 2010;6:12
- 40. Kolerman R, Samorodnitzky-Naveh GR, Barnea E, Tal H: Histomorphometric analysis of newly formed bone after bilateral maxillary sinus augmentation using two different osteoconductive materials and internal collagen membrane. Int J Periodontics Restorative Dent 2012;32:e21–8
- 41. Kolk A, Haczek C, Koch C et al.: A strategy to establish a gene-activated matrix on titanium using gene vectors protected in a polylactide coating. Biomaterials 2011;32:6850–6859
- 42. Kolk A, Handschel J, Drescher W et al.: Current trends and future perspectives of bone substitute materials – from space holders to innovative biomaterials. J Craniomaxillofac Surg 2012;40:706–718
- 43. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J: Robbins and Cotran pathologic basis of disease, Professional Edition: Expert Consult – Online and Print, 8e (Robbins Pathology). 8th ed., Saunders, Philadelphia 2009
- 44. Lane JM, Tomin E, Bostrom MP: Biosynthetic bone grafting. Clin Orthop Relat Res 1999:S107–117
- 45. Lan S, Kehinde T, Zhang X, Khajotia S, Schmidtke DW, Starly B: Controlled release of metronidazole from composite poly-å-caprolactone/alginate (PCL/alginate) rings for dental implants. Dent Mater 2013;29:656–665

- 46. Layton D: A critical appraisal of the survival and complication rates of toothsupported all-ceramic and metal-ceramic fixed dental prostheses: the application of evidence-based dentistry. Int J Prosthodont 2011;24:417–427
- LeGeros RZ: Calcium phosphates in oral biology and medicine. Monogr Oral Sci 1991;15:1–201
- 48. Lindner M, Hoeges S, Meiners W et al.: Manufacturing of individual biodegradable bone substitute implants using selective laser melting technique. J Biomed Mater Res A 2011;97:466–471
- 49. Liu C, Shao H, Chen F, Zheng H: Effects of the granularity of raw materials on the hydration and hardening process of calcium phosphate cement. Biomaterials 2003;24:4103–4113
- Luz GM, Mano JF: Chitosan/bioactive glass nanoparticles composites for biomedical applications. Biomed Mater 2012;7:54104
- 51. Lysaght MJ, Jaklenec A, Deweerd E: Great expectations: private sector activity in tissue engineering, regenerative medicine, and stem cell therapeutics. Tissue Eng Part A 2008;14:305–315
- 52. Mahnama A, Tafazzoli-Shadpour M, Geramipanah F, Mehdi Dehghan M: Verification of the mechanostat theory in mandible remodeling after tooth extraction: animal study and numerical modeling. J Mech Behav Biomed Mater 2013;20:354–362
- Marinucci L, Balloni S, Becchetti E et al.: Effects of hydroxyapatite and biostite on osteogenic induction of hMSC. Ann Biomed Eng 2010;38:640–648
- 54. Mastrangelo F, Quaresima R, Grilli A et al.: A comparison of bovine bone and hydroxyapatite scaffolds during initial bone regeneration: an in vitro evaluation. Implant Dent 2013;22:613–622
- 55. Ma W, Wei J, Li Y et al.: Histological evaluation and surface componential analysis of modified micro-arc oxidation-treated titanium implants. J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater 2008; 86:162–169
- 56. Moore ST, Katz JM, Zhukauskas RM et al.: Osteoconductivity and osteoinductivity of Puros(R) DBM putty. J Biomater Appl 2011;26:151–171
- Mota J, Yu N, Caridade SG et al.: Chitosan/bioactive glass nanoparticle composite membranes for periodontal regeneration. Acta Biomater 2012;8:4173–4180
- Nasr HF, Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA: Bone and bone substitutes. Periodontol 2000 1999;19:74–86
- Nevins M, Nevins ML, Kim S, Schupbach P, Kim DM: The use of mucograft collagen matrix to augment the zone of keratinized tissue around teeth: a pilot study. Int J Periodontics Restorative Dent 2011;31:367–373
- 60. Newman JT, Stahel PF, Smith WR, Resende GV, Hak DJ, Morgan SJ: A new minimally invasive technique for large

volume bone graft harvest for treatment of fracture nonunions. Orthopedics 2008;31:257–261

- 61. Nissan J, Marilena V, Gross O, Mardinger O, Chaushu G: Histomorphometric analysis following augmentation of the posterior mandible using cancellous bone-block allograft. J Biomed Mater Res A 2011;97:509–513
- 62. Nissan J, Marilena V, Gross O, Mardinger O, Chaushu G: Histomorphometric analysis following augmentation of the anterior atrophic maxilla with cancellous bone block allograft. Int J Oral Maxillofac Implants 2012;27:84–89
- 63. Nkenke E, Stelzle F: Clinical outcomes of sinus floor augmentation for implant placement using autogenous bone or bone substitutes: a systematic review. Clin Oral Implants Res 2009; 20(Suppl4):124–133
- 64. Oortgiesen DAW, Plachokova AS, Geenen C et al.: Alkaline phosphatase immobilization onto Bio-Gide and Bio-Oss for periodontal and bone regeneration. J Clin Periodontol 2012;39: 546–555
- 65. Papaioannou KA, Markopoulou CE, Gioni V et al.: Attachment and proliferation of human osteoblast-like cells on guided bone regeneration (GBR) membranes in the absence or presence of nicotine: an in vitro study. Int J Oral Maxillofac Implants 2011;26:509–519
- 66. Payne KFB, Balasundaram I, Deb S, Di Silvio L, Fan KFM: Tissue engineering technology and its possible applications in oral and maxillofacial surgery. Br J Oral Maxillofac Surg 2014;52:7–15
- 67. Petrovic L, Schlegel AK, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J: Different substitute biomaterials as potential scaffolds in tissue engineering. Int J Oral Maxillofac Implants 2006;21:225–231
- Rathe F, Ghanaati S, Schlee M: Humane Histologien nach Rezessionsdeckung mit AlloDermm, Mucograftm, und autologem Bindegewebe; 2011 [cited 2013 Mar 8]. Posterpräsentation, DGParo 9/2011
- Rokkanen PU: Absorbable materials in orthopaedic surgery. Ann Med 1991; 23:109–115
- 70. Rothamel D, Schwarz F, Fienitz T et al.: Biocompatibility and biodegradation of a native porcine pericardium membrane: results of in vitro and in vivo examinations. Int J Oral Maxillofac Implants 2012;27:146–154
- Rupprecht S, Petrovic L, Burchhardt B, Wiltfang J, Neukam FW, Schlegel KA: Antibiotic-containing collagen for the treatment of bone defects. J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater 2007; 83:314–319
- 72. Schaefer D, Kneser U, Munder B, Stark B: Künstliche Gewebe – Tissue Enginee-

ring auch in der Zahnmedizin. Zahnärztl Mitt 2001;91:48–55

- 73. Schliephake H, Zghoul N, Jäger V et al.: Effect of seeding technique and scaffold material on bone formation in tissue-engineered constructs. J Biomed Mater Res A 2009;90:429–437
- 74. Schneider M, Loukota R, Reitemeier B et al.: Bone block fixation by ultrasound activated resorbable pin osteosynthesis: a biomechanical in vitro analysis of stability. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2010; 109:79–85
- 75. Smeets R, El-Moawen A, Jung O et al.: From bench to application: Current practices in tissue engineering and its realisation at maxillofacial units in Germany, Austria and Switzerland. J Craniomaxillofac Surg (2014)
- 76. Smeets R, Gerhards F, Stein JM et al.: A novel hemostatic delivery device for thrombin: biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) 50:50 microspheres. J Biomed Mater Res A 2011;96:177–185
- 77. Smeets R, Kolk A: Osteokonduktive und -induktive Knochenersatzmaterialien. Zahnheilkunde 2010;26:2–11
- 78. Smeets R, Kolk A, Gerressen M et al.: A new biphasic osteoinductive calcium composite material with a negative Zeta potential for bone augmentation. Head Face Med 2009;5:13
- 79. Smeets R, Maciejewski O, Gerressen M et al.: Impact of rhBMP-2 on regeneration of buccal alveolar defects during the osseointegration of transgingival inserted implants. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009;108: e3–e12
- 80. Smeets R, Ulrich D, Unglaub F, Wöltje M, Pallua N: Effect of oxidised regenerated cellulose/collagen matrix on proteases in wound exudate of patients with chronic venous ulceration. Int Wound J 2008;5:195–203
- 81. Song G, Atrens A: Understanding magnesium corrosion – a framework for improved alloy performance. Adv Eng Mater 2003;5:837–858
- 82. Spin-Neto R, Stavropoulos A, Dias Pereira LAV, Marcantonio E, Wenzel A: Fate of autologous and fresh-frozen allogeneic block bone grafts used for ridge augmentation. A CBCT-based analysis. Clin Oral Implants Res 2013; 24:167–173
- 83. Springer ING, Terheyden H, Geiss S, Härle F, Hedderich J, Açil Y: Particulated bone grafts – effectiveness of bone cell supply. Clin Oral Implants Res 2014;15: 205–212
- 84. Stein JM, Fickl S, Yekta SS, Hoischen U, Ocklenburg C, Smeets R: Clinical evaluation of a biphasic calcium composite grafting material in the treatment of human periodontal intrabony defects:

a 12-month randomized controlled clinical trial. J Periodontol 2009;80: 1774–1782

- 85. Takagi S, Chow LC, Markovic M, Friedman CD, Costantino PD: Morphological and phase characterizations of retrieved calcium phosphate cement implants. J Biomed Mater Res 2011;58: 36–41
- 86. Takamiya AS, Goiato MC, Filho HG: Effect of smoking on the survival of dental implants. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub (2013). doi: 10.5507/bp.2013.037. [Epub ahead of print]
- 87. Thoma DS, Sancho-Puchades M, Ettlin DA, Hämmerle CHF, Jung RE: Impact of a collagen matrix on early healing, aesthetics and patient morbidity in oral mucosal wounds – a randomized study in humans. J Clin Periodontol 2012;39: 157–165
- Tolstunov L, Chi J: Alveolar ridge augmentation: Comparison of two socket graft materials in implant cases. Compend Contin Educ Dent 2011;32: E146-E155
- 89. Trautvetter W, Kaps C, Schmelzeisen R, Sauerbier S, Sittinger M: Tissue-engineered polymer-based periosteal bone grafts for maxillary sinus augmentation: five-year clinical results. J Oral Maxillofac Surg 2011;69:2753–2762
- 90. Trombelli L, Penolazzi L, Torreggiani E et al.: Effect of hydroxyapatite-based biomaterials on human osteoblast phenotype. Minerva Stomatol 2010;59: 103–115
- 91. Uezono M, Takakuda K, Kikuchi M, Suzuki S, Moriyama K: Hydroxyapatite/collagen nanocomposite-coated titanium rod for achieving rapid osseointegration onto bone surface. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2013;101:1031–1038. doi: 10.1002/jbm.b.32913. Epub 2013 Apr 2.
- 92. Westas E, Gillstedt M, Lönn-Stensrud J, Bruzell E, Andersson M: Biofilm formation on nanostructured hydroxyapatite coated titanium. J Biomed Mater Res A 2014; 102:1063–1070. doi: 10.1002/ jbm.a.34757. Epub 2013 Jun 12.
- 93. Wiltfang J, Merten HA, Schlegel KA et al.: Degradation characteristics of alpha and beta tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs. J Biomed Mater Res 2002;63:115–121
- 94. Witte F: The history of biodegradable magnesium implants: a review. Acta Biomater 2010;6:1680–1692
- 95. Wood RA, Mealey BL: Histologic comparison of healing after tooth extraction with ridge preservation using mineralized versus demineralized freezedried bone allograft. J Periodontol 2012;83:329–336

### Acta Biomaterialia xxx (2015) xxx-xxx



Contents lists available at ScienceDirect

# Acta Biomaterialia



journal homepage: www.elsevier.com/locate/actabiomat

# Optimized *in vitro* procedure for assessing the cytocompatibility of magnesium-based biomaterials

Ole Jung<sup>a,\*,1</sup>, Ralf Smeets<sup>a,1</sup>, Dario Porchetta<sup>b,c</sup>, Alexander Kopp<sup>b</sup>, Christoph Ptock<sup>b</sup>, Ute Müller<sup>d</sup>, Max Heiland<sup>a</sup>, Max Schwade<sup>e</sup>, Björn Behr<sup>f</sup>, Nadja Kröger<sup>a</sup>, Lan Kluwe<sup>a</sup>, Henning Hanken<sup>a,1</sup>, Philip Hartjen<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup> Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany

<sup>c</sup> Aachen University of Applied Sciences, Biomaterials Laboratory, Aachen, Germany

<sup>d</sup> BMP, Laboratory for Medical Materials Testing, Aachen, Germany

<sup>e</sup> Laboratory for Machine Tools and Production Engineering (WZL) of RWTH Aachen University, Germany

<sup>f</sup> Department of Plastic and Hand Surgery, Burn Center, BG-University Hospital Bergmannsheil, Ruhr University Bochum, Germany

### ARTICLE INFO

Article history: Received 7 August 2014 Received in revised form 15 May 2015 Accepted 4 June 2015 Available online xxxx

Keywords: Magnesium Cytocompatibility In vitro cytotoxicity In vitro biocompatibility Plasma electrolytic oxidation (PEO)

## ABSTRACT

Magnesium (Mg) is a promising biomaterial for degradable implant applications that has been extensively studied *in vitro* and *in vivo* in recent years. In this study, we developed a procedure that allows an optimized and uniform *in vitro* assessment of the cytocompatibility of Mg-based materials while respecting the standard protocol DIN EN ISO 10993-5:2009. The mouse fibroblast line L-929 was chosen as the preferred assay cell line and MEM supplemented with 10% FCS, penicillin/streptomycin and 4 mM L-glutamine as the favored assay medium. The procedure consists of (1) an indirect assessment of effects of soluble Mg corrosion products in material extracts and (2) a direct assessment of the surface compatibility in terms of cell attachment and cytotoxicity originating from active corrosion processes. The indirect assessment allows the quantification of cell-proliferation (BrdU-assay), viability (XTT-assay) as well as cytotoxicity (LDH-assay) of the mouse fibroblasts incubated with material extracts. Direct assessment visualizes cells attached to the test materials by means of live-dead staining. The colorimetric assays and the visual evaluation complement each other and the combination of both provides an optimized and simple procedure for assessing the cytocompatibility of Mg-based biomaterials *in vitro*.

© 2015 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Magnesium is a promising biomaterial for degradable implant applications that has been extensively studied within the last 15 years [1,2]. Its favorable bone-like mechanical properties combined with its degradability make magnesium a preferred candidate for resorbable bone reconstruction materials [1]. Considering clinical use and application, the material properties of magnesium could possibly circumvent numerous disadvantages of currently available products. The major disadvantages of conventional bone reconstruction materials include the necessity for surgical implant removal (e.g. for titanium and steel based implants), graft-versus-host effects, risks of infection and inadequacy for load bearing applications (especially for allogeneic and

<sup>1</sup> Contributed equally.

http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.06.005

1742-7061/© 2015 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: O. Jung et al., Optimized *in vitro* procedure for assessing the cytocompatibility of magnesium-based biomaterials, Acta Biomater. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.06.005

xenogeneic grafts). Furthermore, allergic reactions against metallic and synthetic bone grafts like PLLA (poly-L-lactide) or PLGA (poly(lactic-co-glycolic) acid) may impair applicability and quality outcomes [3–5].

Magnesium is a natural component of the human organism [6] and its mechanical properties bear a close resemblance to those of human cortical bone [1]. Several studies have reported additional beneficial properties such as antibacterial, osteoconductive and osteoinductive effects of magnesium [7–13]. As a major disadvantage, unalloyed magnesium and many magnesium alloys exhibit a low corrosion resistance with concomitant alkalization of surrounding tissues and release of considerable amounts of hydrogen gas at the site of implantation [14–17,19].

Magnesium-based materials intended for medical applications must undergo rigorous tests for cytocompatibility and biocompatibility *in vitro* and *in vivo* with regard to specific characteristics of magnesium such as active corrosion. Importantly, magnesiumcorrosion (and thus its *in vitro* cytotoxicity) is influenced by

<sup>&</sup>lt;sup>b</sup> Meotec GmbH & Co. KG, Aachen, Germany

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel.: +49 40 7410 53251; fax: +49 40 7410 55467. *E-mail address:* ol.jung@uke.de (O. Jung).

various conditions and media-components such as pH and concentrations of HCO<sub>3</sub>, albumin etc. [19–23]. Moreover, magnesiumcorrosion has been reported to interfere with certain commonly used cytotoxicity assays [20]. Numerous protocols and assays considering these special characteristics of Mg-based materials have been developed and efforts toward the standardization of *in vitro* testing procedures for Mg-based biomaterials have been made [20,24–26,28]. For instance, the studies by Fischer et al. [29] and Cipriano et al. [25] developed advanced test conditions for particular direct and extract based tests.

In this study, we set up, tested and analyzed a series of protocols and assays for assessing the cytocompatibility of Mg-based materials *in vitro*. The standard protocol DIN EN ISO 10993-5:2009, which was originally developed for non-degradable materials and has therefore some inherent limitations for assessing degradable metals (further discussed in [29]), was used as the basis for this study. Conventional assays for cell proliferation, viability and cytotoxicity were tested with regard to their feasibility for (1) an indirect assessment of effects of soluble Mg corrosion products in material extracts and (2) a direct assessment of the effects of active Mg corrosion on cells that were cultured directly on the specimens. In an additional direct type assay, cell-attachment to the Mg test-material surface was visualized. Finally, potentiodynamic polarization measurements were conducted to determine corrosion rates of the materials.

### 2. Materials and methods

### 2.1. Specimen preparation

We employed commercially available pure Mg (99.9%) and Mg WE43 (with the following elemental composition: 0.01% Zn + Ag, 4.1% Y, 0.002% Cu, 0.02% Mn, 0.002% Fe, 0.0% Li, 0.000% Ni, 2.2% Nd, 0.5% Zr, 0.65% rare earths, <0.01 other impurities each, remainder Mg) for the experiments. Samples of 18 mm diameter and 1 mm thickness were prepared by wire-EDM (Electrical Discharge Machining). Deionized water was used as dielectric and brass wire as tool electrode with main and trim cut technologies (Sodick AQ537L). After ultrasound degreasing in pure ethanol for 10 min, the specimens were briefly pickled in concentrated 15% HF/30% HNO<sub>3</sub> for surface cleaning. Finally, all samples were washed with distilled water for 15 min and dried on a sterile blanket.

### 2.2. Plasma electrolytic oxidation

Plasma electrolytic oxidation (PEO) was performed using a pulsed rectifier set (Meotec M-PEO A1, Aachen, Germany). Alternating positive and negative pulsed galvanostatic currents of either 2 or 3 A with voltages ranged from 0 to 500 V were applied using two feed cables as anode and cathode. Pulse frequency was set to 20 Hz and disks were treated for up to 15 min. Electrolytes

yielding different surface compositions and roughnesses were used for generating PEO treated materials. The specimens were rinsed with distilled water and dried on a sterile blanket after processing. Samples of each surface were imaged by scanning electron microscopy, SEM (Philips XL30 CP, Amsterdam, Netherlands) and analyzed using energy-dispersive X-ray spectroscopy, EDX (integrated in SEM). Table 1 gives an overview over the different adjustments and parameters during the PEO-procedure and the elemental surface compositions determined using EDX.

### 2.3. Specimen sterilization

All samples were sterilized by immersion in isopropanol for 5 min with subsequent drying in a laminar flow hood.

### 2.4. Reference materials (positive and negative controls)

RM-A, a polyurethane film containing 0.1 % zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC) that was obtained from the Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, Japan was used as a positive control reference material. For live-dead staining assays, Wako plastic sheets (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Cat. No. 160-08893) were used as a nontoxic control material. Samples of RM-A and Wako plastic sheets with the same surface areas as the material specimens were cut and sterilized as described for the specimens.

### 2.5. Potentiodynamic polarization measurements

To determine the degradation rates of the samples, potentiodynamic polarization (PDP) measurements were performed in a three-electrode cell. The experimental setup included an SP-150 potentiostat (Bio-Logic Science Instruments, Claix, France), a glass corrosion cell with MEM medium, an Ag/AgCl, NaCl saturated electrode and a graphite rod as a counter electrode. To achieve a more reliable electrical contact of working electrode (test sample) and conductive circuit, the PEO surface was mechanically removed from the site of contact. Cell degradation material was kept in a controlled environment of 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Variations of the open circuit potential (OCP) were recorded continuously during the immersion time of 1 h. Polarization curves were registered at a scan rate of 30 mV/min and a range from -500 mV to +500 mV with respect to the OCP. Degradation rates in  $\mu$ m/year were calculated using the equation by Stern and Geary as previously described [30].

### 2.6. Cell culture

L-929 mouse fibroblasts were obtained from the European Collection of Cell Cultures, ECACC (Salisbury, UK). Cells were cultured in MEM (Minimum Essential Medium) supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin/streptomycin (100 U/mL each) (all from Life Technologies, Carlsbad, USA) and L-glutamine

### Table 1

Manufacturing and surface composition of surfaces generated using plasma electrolytic oxidation (PEO). Conditions applied during the PEO-process and the results of an energydispersive X-ray spectroscopy (EDX) analysis of the material surfaces are depicted.

Sample	Temperature (°C)	pН	Potential (V)	Current (A. form: AC)	Current density (A/dm <sup>2</sup> )	Time (min)	Surface composition (EDX analysis)
WE43-PEO1	21	10.5	405	0.25	4.3	9.5	C. Mg. P
WE43-PEO2	21	7	315	0.14	0.6	2.5	Mg. P. Y. Zr
WE43-PEO3	21	10	425	0.16	2.8	10.5	Ca. Mg. P. Na. Y. Zr
WE43-PEO4	21	10.4	335	0.14	1.2	4.5	C. Mg. P. Y. Zr
WE43-PEO5	21	7.6	265	0.17	3.1	10.5	C. Mg. P. Na
WE43-PEO6	21	10.3	275	0.34	3.04	3.5	Ca. Cu. Mg. P
WE43-PEO7	21	10.3	335	0.34	3.04	3.5	Ca. Cu. Mg. P. Zr
WE43-PEO8	21	12.6	395	0.06	1.45	6.5	Mg. Si. Na

Please cite this article in press as: 0. Jung et al., Optimized *in vitro* procedure for assessing the cytocompatibility of magnesium-based biomaterials, Acta Biomater. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.06.005

(Sigma–Aldrich, St. Louis, USA) to a final concentration of 4 mM (in the following referred to as cell culture medium) at 37 °C, 5%  $CO_2$  and 95% humidity (cell culture conditions). Cells were passaged when they reached about 80% confluency.

## 2.7. Indirect assays

### 2.7.1. Extraction

Specimens and positive control samples were extracted with  $3 \text{ cm}^2/\text{ml}$  of cell culture medium for 72 h under cell culture conditions. Cell culture medium alone was incubated under identical conditions to serve as a negative control extract. After removal of the specimens, the remaining extracts were centrifuged at 14,000 rpm for 10 min. The supernatants were used for the assays.

### 2.7.2. Assay procedure

96 well plates were seeded with  $1 \times 10^4$  L929 cells/well in 100 µl cell culture medium and incubated under cell culture conditions for 24 h. Thereafter, cell culture medium was discarded and 100 µl of extract were added to each well. Cells were further incubated for 24 h and then subjected to the BrdU- and XTT-assays while the supernatants were subjected to the LDH-assay. Identical assays but omitting cells were conducted for all extracts as a control for assay interference. Blank controls (medium alone without cells) were subtracted from the absorbance values in all assays.

### 2.7.3. BrdU-assay

The "Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)" test kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) was used according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were labeled with BrdU for 2 h under cell culture conditions and subsequently fixed for 30 min at room temperature with FixDenat reagent. Then, the fixed cells were incubated for 1 h with anti-BrdU-POD antibody and washed 3 times for 5 min with washing buffer. The immune complexes were detected after a subsequent substrate reaction with tetramethyl-benzidine (TMB) (20 min at room temperature) followed by addition of 25  $\mu$ l 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to stop the reaction using a scanning multi-well spectrophotometer (ELISA reader) with filters for 450 and 690 nm (reference wavelength).

### 2.7.4. XTT-assay

The "Cell Proliferation Kit II (XTT)" (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) was used according to the manufacturer's instructions. Briefly, the electron-coupling reagent was mixed with XTT labeling reagent (1:50 dilution) and 50  $\mu$ l of the mixture was added to the cells. After 4 h of incubation under cell culture conditions, substrate conversion was quantified by measuring the absorbance of 100  $\mu$ l aliquots in a new 96 well plate using a scanning multi-well spectrophotometer (ELISA reader) with filters for 450 and 650 nm (reference wavelength).

## 2.7.5. LDH-assay

The "LDH-Cytotoxicity Assay Kit II" (BioVision, Milpitas, CA 95035, USA) was used according to the manufacturer's instructions. Briefly,  $10 \,\mu$ l of the cell supernatants were incubated with 100  $\mu$ l LDH reaction mix for 30 min at room temperature. After addition of stopping solution, absorbances were measured using a scanning multi-well spectrophotometer (ELISA reader) with filters for 450 and 650 nm (reference wavelength).

## 2.8. Direct assays

## 2.8.1. Assay procedure

For direct testing, specimens and reference materials were seeded with  $2.4 \times 10^5$  cells in either 1 ml or 1.88 ml cell culture

medium in 12 well plates (for surface-area/medium ratios of 5.65 or  $3 \text{ cm}^2/\text{ml}$  respectively). Cells were seeded directly onto the surface of the materials. Assays were carried out after 24 h incubation under cell culture conditions.

### 2.8.2. Live-dead staining

In order to perform live-dead cell staining on the surfaces of the specimens,  $60 \ \mu$ l per ml medium propidium iodide (PI) stock solution ( $50 \ \mu$ g/ml in PBS) and  $500 \ \mu$ l per ml medium fresh fluorescein diacetate (FDA) working solution ( $20 \ \mu$ g/ml in PBS from 5 mg/ml FDA in acetone stock solution) were added to each well ( $12 \ well$  plate). After a brief incubation for 3 min at room temperature, specimens were rinsed in prewarmed PBS and were immediately examined with an upright fluorescence microscope (Nikon ECLIPSE Ti–S/L100, Nikon GmbH, Düsseldorf, Germany) equipped with a filter for parallel detection of red and green fluorescence.

### 2.8.3. Direct BrdU-, XTT- and LDH assays

BrdU- and XTT-assays were carried out similarly as described for the indirect assay procedure but the reagents were added directly to the cells cultured on the specimens. For the BrdU-assay, 188 µl BrdU labeling solution was added directly to each well containing 1.88 ml medium. Subsequent incubations and washing steps were carried out in the specimen-containing wells. 1 ml FixDenat, 1 ml anti-BrdU-POD working solution, 1 ml washing buffer per washing step and 1 ml substrate solution were used. After incubation, 100 µl of each supernatant was transferred to a 96 well plate, each well containing 25 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, before measuring the absorbance in the same way as previously described for the indirect BrdU-assay. For the XTT assay, 940 µl of labeling mixture (electron-coupling reagent 1:50 in XTT labeling reagent) was added directly to the wells containing 1.88 ml medium. After incubation, 100 µl of each supernatant was transferred to a 96 well plate and the absorbance measured as described for the indirect XTT-assay. LDH assay was carried out with 10 μl supernatant from the cells directly seeded on the specimens. Similar assays omitting cells were conducted for all specimens as a control for assay interference. Blank control absorbance values (medium alone without cells) were subtracted from the absorbance values for all assays.

## 3. Results

# 3.1. Selection of a cell line and a cell culture medium for the cytocompatibility assays

In conformity with DIN EN ISO 10993-5:2009, the mouse fibroblast line L-929 was chosen as the cell line for all assays. These cells are easy to maintain and grow rapidly. To ensure good comparability of *in vitro* cytocompatibility with *in vivo* studies, we wanted to perform our assays in a medium with properties similar to body fluids in living tissues. Thus, to find an adequate medium, we compared compositions of different commonly used simulated body fluids (SBF) with human blood plasma (Table 2). We chose MEM supplemented with 10% FCS and 4 mM L-glutamine as cell culture medium because the concentrations of all ingredients are similar to their concentrations in human blood plasma. Furthermore, it is a well-established cell culture medium for cultivating fibroblasts and is recommended as an appropriate medium in DIN EN ISO 10993-5:2009.

## 3.2. Corrosion of the Mg test materials

We performed potentiodynamic polarization measurements to determine degradation rates of the test samples in  $\mu$ m/year. The results of the PDP-analysis are shown in Table 3 and Fig. 1.

### O. Jung et al./Acta Biomaterialia xxx (2015) xxx-xxx

#### 4

#### Table 2

Compositions of various simulated body fluids (SBFs) in comparison to human blood plasma. Values are taken from product data sheets of Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) and from studies by Walker and Xin et al. [19,31].

	Blood plasma*	DMEM, high glucose	MEM	MEMp	MEM + 10% FCS	EBSS	PBS	Hanks	c-SBF
Na <sup>+</sup> (mM)	142	155.3	144.4	144.4	144.4	144.4	157	142	142
K <sup>+</sup> (mM)	5	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3	4.1	5.9	5
Ca <sup>2+</sup> (mM)	2.5	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	-	1.3	2.5
$Mg^{2+}(mM)$	1.5	0,8	0.8	0.8	0.8	0.8	-	0.8	1.5
$HCO_3^-$ (mM)	27	44.1	26.2	26.2	26.2	26.2	-	4.2	4.2
$Cl^{-}(mM)$	103	117.5	124.4	124.4	124.4	124.4	140	145	147
$HPO_4^{2-}$ (mM)	1	0.9	1.01	1.01	1.01	1.01	11.5	0.8	1
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mM)	0.5	0,8	0.8	0.8	0.8	0.8	-	0.8	0.5
Tris (g l <sup>-1</sup> )	-	_	-	-	-	-	-	-	6.1
Protein (g $l^{-1}$ )	35-50 (albumin)	_	-	40	3–5	-	-	-	-
Amino acids (g l <sup>-1</sup> )	Variable	1.6	0.9	0.9	0.9	-	-	-	-
Glucose (mM)	5	25	5.6	5.6	5.6	5.6	-	1	-
HEPES $(g l^{-1})$	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Concentrations of blood plasma constituents are from the study by Walker et al. [31].

### Table 3

Results of the potentiodynamic polarization (PDP) measurements. Icorr: corrosion current, Ecorr: open circuit potential,  $\beta$ c: slope of the cathodic linear curve,  $\beta$ a: slope of the anodic linear curve, degrate: rate of degradation in  $\mu$ m/year calculated using the equation by Stern and Geary as described in [30]. The degradation rates are results of single measurements.

Sample	Icorr (µA/cm <sup>2</sup> )	Ecorr (mV)	βc (mV)	βa (mV)	Degradation rate (µm/year)
Mg-pure	3.659	-1384.67	166.9	138.4	83.7
WE43	5.272	-1516.684	173.5	85.2	119.3
WE43-PEO1	0.507	132.654	363.3	279.5	11.5
WE43-PEO2	0.152	-1669.536	249.4	166.7	3.4
WE43-PEO3	2.884	-1501.398	186.5	315.1	65.2
WE43-PEO4	0.637	-1418.710	194.5	130.8	14.4
WE43-PEO5	0.502	-1668.708	251.4	248.6	11.4
WE43-PEO6	1.105	-1351.58	196.3	157.2	25
WE43-PEO7	2.141	-1543.27	178.6	274.2	48.4
WE43-PEO8	1.621	-1547.478	173.2	321.5	36.7

Corrosion rates of both reference Mg materials (pure Mg and untreated WE43) were higher than those of the 8 PEO-treated WE43. Among the latter, corrosion rates varied broadly.

## 3.3. Indirect assays

Results of the indirect assays and the controls without cells as well as the results of the calculation [(with cells)-(without cells)] are shown in side-by-side columns in Fig. 2. As expected, extracts of the positive control material RMA, pure Mg and untreated WE43 significantly inhibited cellular proliferation and reduced cellular viability, reflected in low absorbance values in the BrdU- and XTT-assays, respectively (Fig. 2A and B). Accordingly, high absorbance values were measured in the LDH-assay, indicating cytotoxicity (Fig. 2C). Similar inhibitory and cytotoxic effects were measured for one PEO-treated Mg-material (WE43-PEO8). On the contrary, the extracts of the remaining PEO-treated Mg-materials (WE43-PEO1 through 7) exhibited good cytocompatibility in terms of high proliferation, high viability and low cytotoxicity (Fig. 2A-C). Both Mg-references, pure Mg and untreated WE43, were characterized by high corrosion rates reflected in poor cytocompatibility. However, PEO-3 and PEO-7 showed higher corrosion rates than PEO-8, but nevertheless exhibited better cytocompatibility.

Assays that were carried out with the same extracts but omitting cells revealed that soluble corrosion products of magnesium and WE43 have only marginal interfering effects in these assays. The magnitude of the absorbance in BrdU and XTT assays without cells did not exceed 5% of the absorbance for samples that gave a strong signal in the presence of cells. For the LDH-assay, Mg-extracts led to a decrease of absorbance. However, the absolute value of decrease was below 15% for the highest toxicity value that was measured for the positive control RM-A (Fig. 2C). Since the assay values were only marginally altered, subtracting the interference values has no influence on the assessment of the cytocompatibility of the materials. For instance, extracts that scored in the toxic range in the LDH assay (130% above the negative control, which indicates the nontoxic range as defined in DIN EN ISO 10993-5:2009) had a signal about four times higher than toxicity-threshold, even if the interference value was not added.

### 3.4. Direct assays

### 3.4.1. Direct BrdU, XTT and LDH assays

The results from the assays with and without cells as well as the results of the calculation [(with cells) – (without cells)] are shown in side-by-side columns in Fig. 3. In contrast to the indirect testing methods, all three assays showed strong alterations in the presence of Mg (Fig. 3A–C). Especially in the LDH assay, some Mg test materials led to a large decrease of absorbance in the absence of cells that could obscure cytotoxic effects (Fig. 3C). Hence, these *in vitro* assays are not suitable for testing cells which are directly cultured on Mg-test materials. The magnitude of interference is roughly similar for pure Mg and WE43, indicating that the interference originates from the active magnesium-corrosion and not from the alloying elements in WE43.

### 3.4.2. Live-dead staining assay

To assess the direct influence of active magnesium corrosion on the vitality of cells and on cell attachment to material surfaces, cells were seeded on materials directly and subsequent double staining with the live-marker fluorescein diacetate (FDA) and the dead-marker propidium iodide (PI) were performed. Prior to staining, we photographed regions surrounding the specimens in the culture plate using an inverted microscope to additionally assess attachment and morphology of cells in indirect contact with the sample. Representative images for each material are shown in Fig. 4.

While the negative control (Wako plastic sheets) was densely covered with living (green), spindle-shaped cells, no living and only few dead (red) cells were visible on the toxic positive control (RMA) and pure Mg. This was the case for both low (3 cm<sup>2</sup>/ml) and high (5.65 cm<sup>2</sup>/ml) surface-area/medium ratios, indicating low attachment of dead cells to the materials. The untreated WE43 specimens were only sparsely covered with living cells, which

22

O. Jung et al./Acta Biomaterialia xxx (2015) xxx-xxx



**Fig. 1.** Material surfaces and results of the potentiodynamic polarization (PDP) measurements. (A) The plot is a graphical representation of the degradation rates shown in Table 3. The degradation rates are results of single measurements. The images above the plot show scanning electron micrographs of the material surfaces, the scale bars represent a length of 100 µm. (B) The corresponding polarization curves.

showed a rounded morphology at 3  $cm^2/ml$ . At 5.65  $cm^2/ml$ , living cells as well as dead cells were visible on untreated WE43.

Except for WE43-PEO8, all PEO-treated WE43 materials were densely covered with predominantly living cells with a rounded morphology at both surface-area/medium ratios. WE43-PEO8 resembles untreated WE43, albeit being more densely covered with cells. Cells attached to WE43-PEO8 were vital at 3 cm<sup>2</sup>/ml but predominantly dead at 5.65 cm<sup>2</sup>/ml.

The cells surrounding the specimens of the negative control appeared spindle-shaped, while the cells surrounding RMA, pure Mg and WE43 showed a rounded morphology, most likely due to toxic effects of soluble factors at both low  $(3 \text{ cm}^2/\text{ml})$  and high  $(5.65 \text{ cm}^2/\text{ml})$  surface-area/medium ratios.

With the exception of WE43-PEO7 (at  $5.65 \text{ cm}^2/\text{ml}$ ) and WE43-PEO8 (under both conditions), cells surrounding PEO-treated materials exhibited a higher density and a more

Please cite this article in press as: 0. Jung et al., Optimized *in vitro* procedure for assessing the cytocompatibility of magnesium-based biomaterials, Acta Biomater. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.06.005

O. Jung et al. / Acta Biomaterialia xxx (2015) xxx-xxx



**Fig. 2.** Indirect BrdU (A), XTT (B) and LDH-assays (C). Assays were performed following a 24 h incubation of L-929 cells with extracts of the material specimens. Blue columns show the results of the assays carried out in the presence of cells and red columns show the results of identical assays omitting cells that were conducted as a control for assay interference. The results of the calculation [(with cells) – (without cells)] are shown in light blue columns. Blank control values (medium alone without cells) were subtracted from the absorbance values in all assays. Columns represent mean values of quadruplicate measurements of extracts of two specimens per material. Error bars represent the standard deviation. Dotted lines show 70% of the negative control for (A) and (B) and 130% of the negative control for (C) which indicate the nontoxic range as defined in DIN EN ISO 10993-5:2009.

spindle-shaped morphology than their counterparts cultured on the specimens, indicating a less firm attachment to the materials and the absence of soluble cytotoxic factors.

## 4. Discussion

6

We selected, tested and optimized assays and protocols for assessing the cytocompatibility of Mg-based biomaterials *in vitro*. We chose MEM supplemented with 10% FCS and 4 mM L-glutamine as our favored assay medium because of its similar composition to human blood plasma and its similar concentrations of  $HCO_3^-$  and  $HPO_4^{2-}$  and proteins, which can significantly affect magnesium corrosion [19,22,31].

Conventional BrdU, XTT and LDH assays were strongly interfered by direct contact to most Mg test materials, likely due to the interaction of assay components (e.g. tetrazolium) with Mg test materials or short-half-life-time corrosion products as previously shown by Fischer et al. [20].

In contrast, indirect contact with Mg test materials via cell medium did not substantially interfere with the assays. Indirect BrdU-,

O. Jung et al./Acta Biomaterialia xxx (2015) xxx-xxx



**Fig. 3.** Direct BrdU (A), XTT (B) and LDH-assays (C). Assays were performed with L-929 cells that were directly seeded and cultured for 24 h on the material specimens. Blue columns show the results of the assays carried out in the presence of cells. Red columns show the results of identical assays omitting cells that were conducted as a control for assay interference. Results of the calculation [(with cells) – (without cells)] are shown in light blue columns. Blank controls (medium alone without cells) were subtracted from the absorbance values in all assays. Columns represent mean values of duplicate measurements of two specimens per material. Error bars represent the standard deviation. Dotted lines show 70% of the negative control for (A) and (B) and 130% of the negative control for (C) which indicate the nontoxic range as defined in DIN EN ISO 10993-5:2009.

XTT- and LDH-assays are therefore well suited to investigate the effects of soluble factors released from Mg-materials on cellular proliferation and viability. This observation is in contrast to the study by Fischer et al. [20], which reported significant interference in tetrazolium-based XTT- and MTT-assays. The interference in that study is most likely caused by a long incubation time of 24 h with the XTT reagent. We optimized this incubation time to 4 h, which resulted in assay absorbance levels above 1 OD for the negative control with negligible interference for indirect contact

with Mg test materials. Consequently, using this 4 h protocol, it is not necessary to test dilutions of Mg extracts.

As a complement to the indirect colorimetric assays, live-dead staining was used in order to evaluate the compatibility of the surface for cell attachment. Results of the indirect assays matched well with the results of live-dead staining when the latter was carried out at the higher Mg-area/medium ratio (5.65 cm<sup>2</sup>/ml). However, when live-dead staining and colorimetric assays were carried out at the same surface-area/medium ratio (3 cm<sup>2</sup>/ml), a

O. Jung et al. / Acta Biomaterialia xxx (2015) xxx-xxx

	(2.4 )	3 cm²/ml x 10 <sup>5</sup> cells in <i>′</i>	l.88 ml)	5.65 cm²/ml (2.4 x 10 <sup>5</sup> cells in 1 ml)				
	10 x	20 x	Culture plate before staining	10 x	20 x	Culture plate before staining		
Wako plastic (negative control)								
RMA (positive control)		•			• *			
Mg Pure	2º			<b>90</b>	M	10		
WE43		· · · ·	12 m					
WE43-PEO1								
WE43-PEO2								
WE43-PEO3			- 10 m - 1					
WE43-PEO4								
WE43-PEO5								
WE43-PEO6								
WE43-PEO7								
WE43-PEO8			1					

**Fig. 4.** Live-dead staining assay. Double staining with fluoresceindiacetate (FDA) and propidium iodide (PI) was performed on L-929 cells that were directly seeded and cultured for 24 h on the material specimens. The green dye FDA exclusively stains viable cells, dead cells with compromised plasma membrane integrity are stained by the red dye PI. Assay were carried out using two surface-area/medium ratios: low (3 cm<sup>2</sup>/ml) and high (5.65 cm<sup>2</sup>/ml). Left and middle panels show images generated using a 10× and a 20× objective, respectively. Right panels show regions surrounding the specimens, which were photographed prior to staining using an inverted microscope with a  $10\times$  objective. Images of the unstained cells were zoomed digitally.

discrepancy was observed for untreated WE43 and treated WE43-PEO8. Under these conditions, no dead cells were found on these materials, while their extracts were toxic. A possible explanation might be the difference in contact time with the test materials. For indirect assessment, the medium was incubated with the test specimens for 72 h and the cells were further incubated with the extracts for another 24 h. By contrast, for live-dead staining, medium and cells were in contact with the

specimens for only 24 h. During this shorter incubation time, soluble corrosion products may not reach toxic concentrations at 3 cm<sup>2</sup>/ml. Indeed, many of the cells attached to WE43 and WE43-PEO8 were dead at the higher Mg-area/medium ratio of 5.65 cm<sup>2</sup>/ml. Thus, live-dead staining using a higher Mg-area/medium ratio gives more conclusive results for cytocompatibility assessment if no additional indirect assessment is conducted.

26

### O. Jung et al./Acta Biomaterialia xxx (2015) xxx-xxx



Fig. 5. Schematic outline of the procedures for assessing the cytocompatibility of Mg-based materials applied in this study.

A portion of the FDA-positive vital cells on some materials (WE43-PEO2, -6 and -7) exhibited a spindle shaped morphology similar to that of the cells on the negative control material. In our assessment of candidate materials for medical implants, we rated these materials as favorable due to potentially higher cell-viability of cells attached to these materials [32] and potentially better tissue integration *in vivo*. Hence, direct live-dead staining provides important complementary data, concerning the direct influence of active magnesium corrosion and insoluble toxic factors on the viability of cells. Moreover, important additional information on cell attachment to the material surfaces can be obtained.

The two magnesium reference-materials, pure Mg and the untreated WE43, exhibited high corrosion rates, which correlated well with their poor cytocompatibility. However, for some PEO-treated WE43-materials this correlation did not apply. For example, the corrosion rate of WE43-PEO-8 was moderate, while its cytocompatibility was poor. By contrast, the more rapidly corroding PEO-3 and PEO-7 exhibited much better cytocompatibility. This finding demonstrates that the corrosion-rate of modified Mg alone does not accurately predict its cytocompatibility, underlining the necessity of *in vitro* cytocompatibility testing.

Compared to other studies that employed magnesium alloys in similar extract and direct assay methods [20,24–26,28], our protocol is more closely in accordance with DIN ISO 10993-5 (e.g. using L929 cells). The protocols used in the studies cited above differ from this study and each other with regard to cell type, cell numbers, incubation times and choice of assays.

Our procedure is limited to *in vitro* cytocompatibilityassessments of Mg-based materials. Further studies and efforts are necessary to establish validated protocols for accurately predicting *in vivo* biocompatibility from *in vitro* data. Nevertheless, an *in vitro* assessment of cytocompatibility provides a simple and rapid initial screening method, which is particularly useful in the early stages of designing and selecting surface modifications. For instance, modifications with poor cytocompatibility can be excluded from further *in vivo* assessment in animal studies.

## 5. Conclusions

We established a procedure for assessing the cytocompatibility of Mg-based materials *in vitro*. We recommend to use indirect assays for cell proliferation, cell-viability and cytotoxicity in combination with a complementary live-dead staining of cells grown directly on Mg materials. Fig. 5 illustrates the assay procedures applied in this study.

### 6. Disclosures

AK, CP and DP are employed by the Meotec GmbH & Co. KG, a corporation that is specialized in electrochemical surface treatment of metals. Meotec performed the surface treatment of the material specimens used in this study by plasma electrolytic oxidation (PEO). UM is employed by BMP, Laboratory for Medical Materials Testing, a corporation that provides *in vitro* testing services for biomaterials.

## Acknowledgments

This study was funded by the Bundesministerium für Bildung und Forschung, BMBF (FKZ 0316206A-C, BIOMAGIK). This work is the result of the collaboration within the BIOMAGIK consortium. We would like to thank Franziska Flügge for excellent technical assistance.

## Appendix A. Figures with essential color discrimination

Certain figures in this article, particularly Figs. 1–5, are difficult to interpret in black and white. The full color images can be found in the on-line version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015. 06.005.

### References

- M.P. Staiger, A.M. Pietak, J. Huadmai, G. Dias, Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review, Biomaterials 27 (2006) 1728–1734.
- [2] J. Wang, J. Tang, P. Zhang, Y. Li, J. Wang, Y. Lai, et al., Surface modification of magnesium alloys developed for bioabsorbable orthopedic implants: a general review, J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 100 (2012) 1691–1701.
- [3] J. Fischer, A. Kolk, S. Wolfart, C. Pautke, P.H. Warnke, C. Plank, et al., Future of local bone regeneration – protein versus gene therapy, J. Craniomaxillofac. Surg. 39 (2011) 54–64.
- [4] A. Kolk, J. Handschel, W. Drescher, D. Rothamel, F. Kloss, M. Blessmann, et al., Current trends and future perspectives of bone substitute materials – from

### O. Jung et al./Acta Biomaterialia xxx (2015) xxx-xxx

space holders to innovative biomaterials, J. Craniomaxillofac. Surg. 40 (2012) 706-718.

- [5] K.F. Payne, I. Balasundaram, S. Deb, L. Di Silvio, K.F. Fan, Tissue engineering technology and its possible applications in oral and maxillofacial surgery, Br. J. Oral Maxillofac. Surg. 52 (2014) 7–15.
- [6] N.E. Saris, E. Mervaala, H. Karppanen, J.A. Khawaja, A. Lewenstam, Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects, Clin. Chim. Acta 294 (2000) 1–26.
- [7] G.A. Fielding, W. Smoot, S. Bose, Effects of SiO, SrO, MgO, and ZnO dopants in tricalcium phosphates on osteoblastic Runx2 expression, J. Biomed. Mater. Res. A (2013).
- [8] J.Y. Lock, E. Wyatt, S. Upadhyayula, A. Whall, V. Nunez, V.I. Vullev, et al., Degradation and antibacterial properties of magnesium alloys in artificial urine for potential resorbable ureteral stent applications, J. Biomed. Mater. Res. A 102 (2014) 781–792.
- [9] J.W. Park, H.J. Ko, J.H. Jang, H. Kang, J.Y. Suh, Increased new bone formation with a surface magnesium-incorporated deproteinized porcine bone substitute in rabbit calvarial defects, J. Biomed. Mater. Res. A 100 (2012) 834–840.
- [10] D.A. Robinson, R.W. Griffith, D. Shechtman, R.B. Evans, M.G. Conzemius, *In vitro* antibacterial properties of magnesium metal against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, Acta Biomater. 6 (2010) 1869–1877.
- [11] D. Tie, F. Feyerabend, W.D. Muller, R. Schade, K. Liefeith, K.U. Kainer, et al., Antibacterial biodegradable Mg-Ag alloys, Eur. Cells Mater. 25 (2013) 284– 298 (discussion 98).
- [12] K.F. Farraro, K.E. Kim, S.L. Woo, J.R. Flowers, M.B. McCullough, Revolutionizing orthopaedic biomaterials: the potential of biodegradable and bioresorbable magnesium-based materials for functional tissue engineering, J. Biomech. 47 (2014) 1979–1986.
- [13] F. Witte, V. Kaese, H. Haferkamp, E. Switzer, A. Meyer-Lindenberg, C.J. Wirth, et al., *In vivo* corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response, Biomaterials 26 (2005) 3557–3563.
- [14] S.F. Fischerauer, T. Kraus, X. Wu, S. Tangl, E. Sorantin, A.C. Hanzi, et al., *In vivo* degradation performance of micro-arc-oxidized magnesium implants: a micro-CT study in rats, Acta Biomater. 9 (2013) 5411–5420.
- [15] K.W. Guo, A review of magnesium/magnesium alloys corrosion and its protection, Recent Patents Corros. Sci. 2 (2010) 13–21.
- [16] W.D. Mueller, M. Lucia Nascimento, M.F. Lorenzo de Mele, Critical discussion of the results from different corrosion studies of Mg and Mg alloys for biomaterial applications, Acta Biomater. 6 (2010) 1749–1755.

- [17] D. Persaud-Sharma, A. McGoron, Biodegradable magnesium alloys: a review of material development and applications, J. Biomim. Biomater. Tissue Eng. 12 (2012) 25–39.
- [19] Y. Xin, T. Hu, P.K. Chu, *In vitro* studies of biomedical magnesium alloys in a simulated physiological environment: a review, Acta Biomater. 7 (2011) 1452–1459.
- [20] J. Fischer, M.H. Prosenc, M. Wolff, N. Hort, R. Willumeit, F. Feyerabend, Interference of magnesium corrosion with tetrazolium-based cytotoxicity assays, Acta Biomater. 6 (2010) 1813–1823.
- [21] G.L. Song, A. Atrens, Understanding magnesium corrosion a framework for improved alloy performance, Adv. Eng. Mater. 5 (2003) 837–858.
- [22] Y.C. Xin, T. Hu, P.K. Chu, Degradation behaviour of pure magnesium in simulated body fluids with different concentrations of HCO<sub>3</sub>, Corros. Sci. 53 (2011) 1522–1528.
- [23] W.F. Ng, K.Y. Chiu, F.T. Cheng, Effect of pH on the *in vitro* corrosion rate of magnesium degradable implant material, Mat. Sci. Eng. C Mater. 30 (2010) 898–903.
- [24] Y. Chen, J. Yan, C. Zhao, S. Zhang, S. Yu, Z. Wang, et al., *In vitro* and *in vivo* assessment of the biocompatibility of an Mg-6Z(n) alloy in the bile, J. Mater. Sci. Mater. Med. 25 (2014) 471–480.
- [25] A.F. Cipriano, A. Sallee, R.G. Guan, Z.Y. Zhao, M. Tayoba, J. Sanchez, et al., Investigation of magnesium-zinc-calcium alloys and bone marrow derived mesenchymal stem cell response in direct culture, Acta Biomater. 12 (2015) 298–321.
- [26] D. Hong, P. Saha, D.T. Chou, B. Lee, B.E. Collins, Z. Tan, et al., *In vitro* degradation and cytotoxicity response of Mg-4% Zn-0.5% Zr (ZK40) alloy as a potential biodegradable material, Acta Biomater. 9 (2013) 8534–8547.
- [28] Y.B. Wang, X.H. Xie, H.F. Li, X.L. Wang, M.Z. Zhao, E.W. Zhang, et al., Biodegradable CaMgZn bulk metallic glass for potential skeletal application, Acta Biomater. 7 (2011) 3196–3208.
- [29] J. Fischer, D. Profrock, N. Hort, R. Willumeit, F. Feyerabend, Reprint of: improved cytotoxicity testing of magnesium materials, Mater. Sci. Eng. B Adv. 176 (2011) 1773–1777.
- [30] M. Ascencio, M. Pekguleryuz, S. Omanovic, An investigation of the corrosion mechanisms of WE43 Mg alloy in a modified simulated body fluid solution: the influence of immersion time, Corros. Sci. 87 (2014) 489–503.
- [31] J. Walker, S. Shadanbaz, N.T. Kirkland, E. Stace, T. Woodfield, M.P. Staiger, et al., Magnesium alloys: predicting *in vivo* corrosion with *in vitro* immersion testing, J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 100 (2012) 1134–1141.
- [32] O. Kepp, L. Galluzzi, M. Lipinski, J. Yuan, G. Kroemer, Cell death assays for drug discovery, Nat. Rev. Drug Discov. 10 (2011) 221–237.

10

# Zusammenfassende Darstellung der Publikationspromotion

Die vorliegende Dissertation setzt sich aus den beiden Publikationen "*Was können* regenerative Materialien in der Zahnmedizin leisten – und wo sind die Grenzen" (Seiten 5 bis 18) sowie "*Optimized in vitro procedure for assessing the cytocompatibility of magnesium*based biomaterials" (Seiten 19 bis 28) zusammen. Die erste Publikation ist dabei als eine Einleitung in das Themengebiet um regenerative Materialien und Ansätze in der Kieferchirurgie im Allgemeinen zu verstehen. Die englischsprachige Publikation ist das Hauptaugenmerk der vorliegenden Publikationspromotion. Beide Artikel wurden in nationalsowie international hochrangigen Zeitschriften mit hohem Leseraufkommen publiziert. Die Relevanz des Publikationsthemas wird durch mehrere nationale- und internationale Posterpräsentationen, Vorträge und Preise verdeutlicht (siehe Anhang, Seiten 43 bis 44). Die im folgenden Text teilweise verwendeten Verweise auf englischsprachige Abbildungen (*Figures*) und Tabellen (*Tables*) beziehen sich jeweilig auf die genannte englischsprachige Publikation. Deutsche Pendants beziehen sich auf die nachfolgende Zusammenfassung.

# Einleitung

Die regenerative Medizin erlangt unter dem Aspekt eines enormen wirtschaftlichen Potentials immer mehr an Bedeutung in der industriellen- sowie universitären Forschung (Lysaght et al. 2008, Mason 2007, Polykandriotis et al. 2010, Smeets et al. 2014c). Der Bereich setzt sich dabei intra-und interdisziplinär mit der Entwicklungsarbeit um regenerative Materialien mit den Zielen der Reparation, Regeneration sowie des teilweisen oder vollständigen Gewebeersatzes auseinander (Smeets et al. 2014a, Smeets et al. 2014b, Smeets et al. 2014c).

In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie nimmt die Gruppe der Knochenersatzmaterialien (KEM) als Teil des regenerativen Konzepts eine vornehmliche Stellung bezüglich rekonstruktiv-ästhetischer Fragestellungen ein, wobei sich natürliche (z.B. autologe KEM), synthetische (z.B. Metalle, Keramiken) und Verbundwerkstoffe ("Komposite") unterscheiden lassen (Fischer et al. 2011, Kolk et al. 2012, Smeets et al. 2014a, Smeets et al. 2014c). Je nach Anforderungsprofil und Funktion weisen die verschiedenen Klassen Vorund Nachteile auf. Beispielsweise entstehen durch autologe Transplantate, welche gemäß der aktuellen Studienlage weiterhin als Goldstandard gelten, zusätzliche Defekte an der Entnahmestelle. Dahin gehend weisen artifizielle KEM häufig Nachteile bezüglich Funktion (z.B. Osteoinduktion- und konduktion, allergische Reaktionen), Stabilität (v.a. Biogläser) und Degradation (z.B. Titanlegierungen) auf (Jung et al. 2015, Smeets et al. 2014c). Für die Rekonstruktion großflächiger Knochendefekte des knöchernen Neuro- und Viszerokraniums, spezifisch solche der Mandibula und Maxilla, bestehen grob gegliedert zurzeit zwei Therapieoptionen: Die Wiederherstellung der knöchernen Kontinuität mittels Rekonstruktionsplatten auf Metallbasis (v.a. Titanlegierungen) oder das autologe Fibulatransplantat. Diese Lösungsansätze weisen je nach Indikationsstellung (z.B. Größe des Defekts, Alter, Prognose, knöchernes Angebot) spezifische Nachteile auf. So müssen nicht-resorbierbare bzw. nicht-degradierbare Metallimplantate meist in einer zweiten Operation wieder entfernt werden und haben singulär eingesetzt Einschränkungen hinsichtlich der maximalen Reichweite der Überbrückung (ca. 5 cm). Die aufwendigen Fibulatransplantate erfordern einen zweiten Operationssitus und ebenfalls eine Fixierung mittels nicht-resorbierbaren Osteosyntheseplatten (Jung et al. 2015, Smeets et al. 2014c). Ferner kann die Vorstellung eines postoperativ fehlenden Wadenbeins Unbehaglichkeiten bei Pateinten hervorrufen.

Die genannten Nachteile könnten durch den Einsatz individueller und mittels generativ bzw. additiv (Englisch: "selective laser melting") oder wie in der vorliegenden Arbeit funkenerosiv bearbeiteten degradierbaren Magnesiumimplantaten ausgeräumt werden. Magnesium selbst stellt dabei ein Biomaterial dar, welchem innerhalb der letzten 15 Jahre große Aufmerksamkeit zuteil wurde (Jung et al. 2015, Staiger et al. 2006, Wang et al. 2012, Witte 2010, Yang et al. 2011). Als natürlich vorkommendes und lebenswichtiges Mineral im Körper weist es im Vergleich zum kortikalen Knochen des Menschen teilweise bessere mechanische Eigenschaften hinsichtlich der Parameter Bruchzähigkeit und Elastizität bei gegebenen Leichtbaueigenschaften auf (Jung et al. 2015, Staiger et al. 2006, Wang et al. 2012, Witte 2010, Yang et al. 2011). Weiterhin konnten in einigen Studien antibakterielle wie auch osteoinduktive- und konduktive Eigenschaften von Magnesium aufgezeigt werden (Farraro et al. 2014, Fielding et al. 2014, Lock et al. 2014, Park et al. 2012, Robinson et al. 2010, Tie et al. 2013, Witte et al. 2005). Ein Nachteil degradierbarer unbeschichteter Magnesiumlegierungen ist vor allem in der schnellen Degradation über wenige Wochen nach Einsatz in einer physiologischen pH-Umgebung zu nennen. Die damit einhergehende Alkalisierung und toxische Wirkung auf das umgebende Gewebe verhindert einerseits eine effiziente Knochenregeneration und bedingt zum anderen Einschränkungen hinsichtlich lasttragender Indikationen (Jung et al. 2015, Smeets et al. 2014c, Staiger et al. 2006).

Eine Steigerung der Korrosionsresistenz kann theoretisch durch verschiedene Modifikationen der Magnesiumoberfläche erreicht werden, wobei die Beschichtung mittels Plasmaanodisation (Englisch: "*plasma electrolytic oxidation*" (PEO), veraltet auch: "*micro-arc oxidation*" (MAO)) eine vielversprechende Neuentwicklung darstellt. Im Vergleich zur konventionellen Anodisation können durch PEO korrosionsresistentere und verschleißbeständigere Schichten generiert werden (*Abbildung 1*) (Hornberger et al. 2012). In einem Elektrolyten befindend wird das Werkstück durch die Anlage einer Spannung über dem dielektrischen Durchschlagspotential (Englisch: *"dielectric breaktdown potential"*) beschichtet. Dabei entsteht eine Oxidschicht durch Entladungen an der Oberfläche des Werkstücks, wobei die Zusammensetzung maßgeblich durch die Elektrolytkomposition bestimmt wird.

Für medizinische Applikationen sind vor einem etwaigen in vivo-Einsatz von Magnesiumlegierungen standardisierte und optimierte Zytokompatibilitätstests notwendig, welche angelehnt an die Normbestimmungen der DIN ISO 10993-5:2009 und weiter gefasst auch der DIN ISO 10993-12:2012 die spätere in vivo-Situation und die Korrosionsresistenz möglichst naheliegend abbilden sollten. Da die eigentliche Korrosion von Magnesium von verschiedenen Einflussfaktoren abhängig ist (z.B. pH, Proteine, HCO<sub>3</sub>), sollten neben der Wahl eines dem humanen physiologischen Blutplasma ähnlichen Korrosionsmediums möglichst einfache Methoden zum Einsatz kommen, welche eine Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit von verschiedenen Studien ermöglichen (Fischer et al. 2012, Ng et al. 2010, Song and Atrens 2003, Xin et al. 2011b, Xin et al. 2011a). So sind bisherig in verschiedenen Studien und Protokollen bezüglich der Zytokompatibilitätsanalysen von Magnesiumlegierungen unterschiedliche Ansätze zur Durchführung (z.B. direkt vs. Extraktionstests, Zellentität, Zellzahl, Inkubationszeit von Untersuchungsmethoden etc.) aufgezeigt worden. Neben der Empfehlung von Verdünnungsreihen wurden hierbei auch Interferenzen von Magnesium mit verschiedenen Zytotoxizitätstests (BrdU, MTT, XTT) beschrieben (Chen et al. 2014, Cipriano et al. 2015, Fischer et al. 2012, Fischer et al. 2010, Hong et al. 2013, Wang et al. 2011). Durch in vitro-Verdünnungsreihen wird allerdings eine möglichst ähnlich abzubildende in vivo-Situation gänzlich vernachlässigt.

Die vorliegende Publikationsdissertation führt neben den angedeuteten grundsätzlichen Überlegungen zur Verbesserung der Zytotoxizitätsanalysen für Magnesiumprüfmuster auch die Darstellung einer solchen *in vitro*-Optimierung aus. Weiterhin werden Rückschlüsse zur Weiterentwicklung plasmaanodisierter Schichtsysteme auf Magnesiumprüfmustern aufgezeigt.

# Material und Methoden

Die Prüfmuster mit einem Durchmesser von 18 mm bei 1 mm Dicke wurden mittels Funkenerosion auf Basis einer reinen Magnesiumlegierung (*Mg-pure*, 99.9% rein) sowie der Magnesiumlegierung WE43 (Zusammensetzung: vergleiche Publikation Seite 20) mit einem Durchmesser von 18 mm bei 1 mm Dicke hergestellt und gereinigt (Ultraschallbad in reinem Ethanol für 10 Minuten, Beizen in 15% HF/30%, destilliertes Wasser für 15 Minuten, Trocknung auf einem sterilen Tuch). Neben den unbeschichteten Referenzproben Mg-pure und WE43 wurden anschließend acht WE43-Prüfmuster (PEO 1-8) in verschiedenen Elektrolyten PEO beschichtet (*Abbildung 1, Table 1* Seite 20).



**Abbildung 1:** Schemazeichnung des Prozesses der Plasmaanodisation (links). Hierbei wird durch das Einstellen einer Spannung über 200 V das dielektrische Durchschlagspotential der wachsenden Oxidschicht überschritten, was zu lokalen Plasmareaktionen bei hohen Temperaturen und Drücken mit Modifizierung der Oxidschicht führt. Im rechten Bild ist eine solche Reaktion an der Oberfläche ersichtlich.

Die Degradationsraten der beschichteten und unbeschichteten Proben wurden durch die elektrochemische Methode der potentiodynamischen Polarisation (PDP, *Abbildung 2*) mit anschließender Berechnung gemäß der Formel nach *Stern* und *Geary* bestimmt (Ascencio et al. 2014). Hierfür wurden die Prüfmuster (PEO 1-8, WE43, Mg-pure) der Testvorrichtung bestehend aus der Messzelle mit ihren drei Elektroden, "Minimum Essential Medium" (MEM) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 100U/ml Penstrep und 4 mM Glutamin als Korrosionsmedium sowie SP-150 Potentionstat zugeführt. Während der Immersionszeit von einer Stunde wurde das freie Korrosionspotential (Englisch: *"open circuit potential"*) kontinuierlich aufgezeichnet.



**Abbildung 2**: Schemazeichnung der potentiodynamischen Untersuchungsmethode. Das Prüfmuster ist als Arbeitselektrode gekennzeichnet. Durch Anlegen einer Spannung wird das freie Korrosionspotential kontinuierlich aufgezeichnet. Durch die Formel nach Stern und Geary kann hieraus die Degradationsgeschwindigkeit eines Werkstücks berechnet werden (Ascencio et al. 2014).

Für die Zellexperimente wurden angelehnt an die DIN ISO 10993-5:2009 und DIN ISO 10993-12:2012 L929-Mausfibroblasten in MEM mit 10% FCS, 100U/ml Penstrep und 4 mM Glutamin (Zellkulturmedium) bei 37 °C, 5% CO2 und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert (Zellkulturkonditionen). Das Testsystem zur Validierung der Zytokompatibilität setzte sich aus Extraktionstests (indirekt) und direkten Tests mittels kolorimetrischen Untersuchungen sowie Vitalfärbungen (*"live-dead staining"*) als Erweiterung des direkten Testniveaus zusammen. Neben den Prüfmustern (WE43-PE01-8, WE43, Mg-pure) wurden zwecks Referenzermittlung Positiv- (RM-A), Negativ- (ledigliche Zellkultivierung in Abwesenheit von Prüfmustern bzw. Plastikprüfmuster (Wako) bei den Vitafärbungen) und Blindkontrollen (Prüfung ohne Prüfmuster und Zellen, wird von den Ergebnissen der übrigen Prüfmuster subtrahiert) durchgeführt. Zwecks Validierung einer etwaigen Interferenz in den kolorimetrischen Untersuchungen wurden alle Prüfmuster ebenfalls in Abwesenheit von Zellen getestet.

Für die Extraktionstests wurden die unbeschichteten und beschichteten Prüfmuster in 3 cm<sup>2</sup>/ml Zellkulturmedium unter Zellkulturkonditionen über 72 extrahiert, das Extraktionsmedium anschließend zentrifugiert und auf vorbereitete 96-Well-Platten mit 1 x 10<sup>4</sup> L929-Zellen pipettiert. Nach 24 stündiger Inkubationszeit wurden gemäß Herstellerinformationen und angelehnt an die DIN ISO 10993-5:2009 BrdU-, XTT- und LDH-Untersuchungen durchgeführt.

Gleichsame kolorimetrische Untersuchungen wurden in direkten Tests durch die direkte Kultivierung von 2.4 x  $10^5$  L929-Zellen über 24 Stunden in 1 ml sowie 1.88 ml Zellkulturmedium (entsprechend 5.65 und 3 cm<sup>2</sup>/ml) unter Zellkulturkonditionen erreicht.

Die Vitalfärbungen wurden gemäß der direkten Zellkultivierung über 24 Stunden mit anschließender Zugabe von Propidiumiodid und Fluoresceindiacetat, 3-minütiger Inkubationszeit, Reinigung mittels *"phosphate buffered saline"* (PBS) sowie anschließender Mikroskopie unter Fluoreszenz durchgeführt.

# Ergebnisse

## I. Entwicklung von plasmaanodisierten Magnesiumprüfmustern

In einem ersten Schritt konnten plasmaanodisierte Schichtsysteme für Magnesiumprüfmuster entwickelt werden.

Diese zeigten sich gemäß der angewendeten Prozessparameter im REM verschieden strukturiert und rau (*Figure 1 A* Seite 23).

Bezüglich der Korrosionsresistenz der Prüfmuster in der PDP zeigten alle PEO beschichteten Muster eine niedrigere Degradationsrate im Vergleich zu den unbeschichteten Magnesiumproben WE43 und Mg-pure (*Figure 1 B* Seite 23, *Table 3* Seite 22). Mit 3.4  $\mu$ m/Jahr Degradationsrate konnte hier beispielsweise die Schicht WE43-PEO2 eine 35 x-fach niedrigere Rate im Vergleich zu dem unbeschichteten Prüfmuster WE43 aufzeigen. Im Vergleich WE43-PEO2 zu Mg-pure war eine 25 x-fach niedrigere Degradationsgeschwindigkeit für das beschichtete Prüfmuster feststellbar.

Die Zytokompatibilität der beschichteten und unbeschichteten Prüfmuster wurde im Rahmen der Optimierung der Zytokompatibilitätsanalyse für Magnesiumwerkstoffe untersucht (Teil II der nachfolgenden Ergebnisdarstellung).

## II. Optimierung der in vitro-Zytokompatibilitätsanalyse von Magnesiumwerkstoffen

In einem weiteren Schritt wurden optimierte Methoden zur Testung der Zytokompatibilität beschichteter und unbeschichteter Magnesiumlegierungen etabliert. Diese sollen eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zukünftiger Studien zu Magnesium basierten Biomaterialien ermöglichen.

Hierbei zeigte sich neben der Berücksichtigung von L929-Mausfibroblasten als etablierte und primär zu testende Zelllinie vor allem die Wahl des Zellkulturmedium MEM mit 10% FCS und 4 mM Glutamin als geeignet, um eine etwaige Ähnlichkeit zum physiologischen Blutplasma des Menschen zu gewährleisten (*Table 2* Seite 22).

In den indirekten kolorimetrischen Extraktionstests waren bis auf die unbeschichteten Prüfmuster, WE43-PEO8 und die Positivkontrolle alle weiteren PEO-Proben gemäß DIN ISO 10993-5:2009 zytokompatibel (*Figure 2* Seite 24). Etwaige Interferenzen lagen in den BrdUund XTT-Untersuchungen unter +/- 5% im Vergleich zur Negativkontrolle und in den LDH-Untersuchungen unter 15% zur Positivkontrolle. Interferenzen waren dabei vor allem bei den unbeschichteten bzw. schnell degradierbaren Prüfmustern (Mg-pure, WE43, WE43-PEO7, WE43-PEO8) ersichtlich. In den direkten kolorimetrischen Tests zeigten alle Prüfmuster in mindestens einer BrdU-, XTT- oder LDH-Untersuchung eine Zytotoxizität auf (*Figure 3* Seite 25). Weiterhin waren teils starke Interferenzen ersichtlich, was sich wiederum vor allem auf die schnell degradierbaren Proben (Mg-pure, WE43, WE43-PEO3, WE43-PEO7, WE43-PEO8) gemäß PDP-Untersuchung bezog. Interessanteweise zeigten sich etwaige LDH-Interferenzen in den direkten und indirekten kolorimetrischen Untersuchungen im Vergleich zu den BrdU- und XTT-Untersuchungen im negativen Skalenniveau.

Für die Validierung der direkten Zellreaktion wurden Vitalfärbungen bei verschiedenen Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnissen (3 und 5.65 cm<sup>2</sup>/ml Zellkulturmedium) durchgeführt (*Figure 4* Seite 26). Hier zeigten sich vor allem bei 5.65 cm<sup>2</sup>/ml aussagekräftige Effekte zur Toxizität der PEO-beschichteten Prüfmuster, wobei unter beiden Konzentrationen die unbeschichteten Prüfmuster nur spärlich mit lebenden (grünen) Zellen bedeckt waren. Insgesamt konnten bei 5.65 cm<sup>2</sup>/ml Zellkulturmedium bis auf WE43-PEO8 alle PEO-Schichtsysteme lebende Zellen auf der Oberfläche aufzeigen. Vor allem auf der Oberfläche WE43-PEO2 waren lebende, spindelförmige und adhärente Zellen ohne tote Zellen ersichtlich. Bei 3 cm<sup>2</sup>/ml Zellkulturmedium zeigte auch WE43-PEO8 keine toxischen Effekte mehr, was sich am wahrscheinlichsten durch niedrigere toxische Konzentrationen an löslichen Faktoren im Medium begründen lässt.

# Diskussion

Neben erfolgreichen Entwicklung zytokompatibler plasmaanodisierter der Magnesiumprüfmuster erhöhter Korrosionsresistenz konnte ein funktionierendes Testprotokoll für grundlegende Bestimmungen der Zytokompatibilität von beschichteten und unbeschichteten Magnesiumlegierungen entwickelt werden (Figure 5 Seite 27). Hierfür wurden zum einen L929-Zellen, welche als wenig anfällig für äußere Einflüsse gelten, als etablierte Zelllinie ausgewählt. Zum anderen wurde MEM mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin-Streptomycin und 4 mM Glutamin als primäres Zellkultur- und Korrosionsmedium etabliert, da es zum einen dem humanen Blutplasma sehr ähnelt und zum anderen der Zusatz von Proteinen die Korrosion von Magnesium beeinflusst (Table 2 Seite 22) (Walker et al. 2012, Xin et al. 2011b, Xin et al. 2011a).

Direkte kolorimetrische Tests mittels BrdU, XTT und LDH zeigten sich aufgrund von Interferenzen von extrahierten Korrosionsprodukten wenig geeignet zur Bestimmung der Zytokompatibilität von Prüfmustern auf Magnesiumbasis. Dagegen sind Interferenzen in den indirekten Tests gemäß des hier entwickelten Protokolls nur geringfügig feststellbar, wodurch eine der *in vivo*-Situation naheliegende Testung ermöglicht wird. Ein Verdünnung von Extrakten wie von *Fischer* und *Wang et al.* gefordert ist somit nicht nötig und würde das Testergebnis unnötig verfälschen (Fischer et al. 2012, Wang et al. 2015).

Für die Beurteilung der direkten Zytokompatibilität ist die Durchführung von Vitalfärbungen unter dem Fluoreszenzmikroskop empfehlenswert. Hierbei sollte das Verhältnis von Prüfmusterfläche zu Mediummenge so gewählt werden, dass eine hinreichende Beurteilung möglich ist. Das war bei 5.65 cm<sup>2</sup>/ml der Fall, da bei höheren Mengen an Medium auch etwaige toxische Extraktionsprodukte in ihrer Gesamtkonzentration niedriger sind. So variierten die Ergebnisse bei den Prüfmustern WE43-PEO8 und WE43 bezüglich der Mengenverhältnisse des Mediums (3 und 5.65 cm<sup>2</sup>/ml Zellkulturmedium) gänzlich (bei WE43-PEO8) oder teilweise (bei WE43). Dies wurde durch die Umkehr von eher toten Zellen auf der Oberfläche zu mehr lebenden Zellen auf der Oberfläche bei niedrigerem Verhältnis Prüfmusterfläche zu Mediummenge deutlich. Mit spindelförmig adhärenten und lebenden Zellen zeigten sich die Oberflächen WE43-PEO2, -6 und-7 am besten geeignet für zukünftige Applikationen.

Im Zusammenhang mit der elektrochemisch ermittelten Degradationsrate erscheint eine Korrelation der Ergebnisse für die beschichteten Prüfmuster nicht sicher. So waren die Degradationsraten der Proben WE43-PEO3- und 7 höher als die von WE43-PEO8, konnten aber wiederum eine bessere Zytokompatibilität aufzeigen. Somit ist die singuläre Beurteilung der Prüfmuster durch ledigliche elektrochemische Degradationsbestimmungen nicht valide und sollte als Zusatz der Zytokompatibilitätsanalyse gemäß DIN ISO 10993-5:2009 angesehen werden. In der Gesamtbeurteilung ist deshalb eine Weiterentwicklung der Oberfläche WE43-PEO2 vielversprechend.

In direktem Vergleich mit Studien ähnlicher Thematik erlaubt die vorliegende schnelle Forschungsarbeit eine und valide Zytokompatibilitätsanalyse von Magnesiumlegierungen angelehnt an die DIN ISO 10993-5:2005 sowie weiter gefasst auch DIN ISO 10993-12:2012, wobei u.a. Unterschiede bezüglich des Zelltyps, Zellzahl, Inkubationszeiten sowie Untersuchungsmethoden (u.a. XTT vs. MTT) bestehen (Chen et al. 2014, Cipriano et al. 2015, Fischer et al. 2012, Fischer et al. 2010, Hong et al. 2013, Wang et al. 2011). Dabei sollten weitergehende Forschungsansätze die mögliche Erweiterung einer in vitro-Zytokompatibilitätsdiagnostik anstreben, wodurch eine möglichst exakte Abbildung bzw. Simulation der in vivo-Situation ermöglicht wird. Dies würde neben ethischen Gesichtspunkten (v.a. Reduktion von Tierversuchen) auch Kosten- sowie Zeitvorteile bedingen.

# Zusammenfassung und Ausblick

Zusammengefasst konnte ein valides Testprotokoll zur Zytokompatibilitätsanalyse von Prüfmustern auf Magnesiumbasis gemäß DIN ISO 10993-5:2009 erstellt werden, welches eine zukünftige Vergleichbarkeit von Studien zur selbigen Thematik verbessern könnte, bisherige Probleme mit Interferenzen behebt sowie Testbedingungen schafft, die möglichst nah die spätere *in vivo*-Situation abbilden. Weiterhin wurden zytokompatible PEO-Schichtsysteme für Magnesiumlegierungen entwickelt, welche die Degradation bzw. Korrosion um ein vielfaches verlangsamen.

In weiteren Forschungsbemühungen der Forschungsgruppe sind Erweiterungen der hier vorliegenden Ergebnisse um einige grundlagenwissenschaftliche Methoden vorgesehen, um eine Simulation der späteren in vivo-Situation noch zuverlässiger zu ermöglichen. Neben der Einführung weiterer Zelltypen (z.B. primäre Osteoblasten) betrifft dies auf experimenteller Ebene Extraktionsanalysen mittels HPLC, die Entwicklung eines geschlossenen sowie gleichzeitig funktionalen Degradationsstands, Untersuchungen der Grenzflächenaktivität von besonders strukturierten PEO-Schichten sowie die Untersuchung des Einflusses von Albumin auf die Korrosion von Magnesiumlegierungen. Im weiteren Verlauf sind in vivodes kompatibelsten **PEO-Magnesiumimplantats** mit unterschiedlichen Analysen Kanalstrukturen (400-800 µm) vorgesehen, um die Biokompatibilität, Degradation als auch die Osseointegration im Tiermodell zu beurteilen (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Prototyp eines funkenerosiv generierten und PEO-beschichteten Magnesiumimplantats mit Kanalgrößen von 800 µm. Neben einem makroskopischen Bild (links) sind elektronenmikroskopische Bilder (mittig, rechts) beigefügt.

# Literaturverzeichnis

Ascencio M, Pekguleryuz M, Omanovica S (2014) An investigation of the corrosion mechanisms of WE43 Mg alloy in a modified simulated body fluid solution: The influence of immersion time. Corrosions Science. 87:489-503.

Chen Y, Yan J, Zhao C, Zhang S, Yu S, Wang Z, Wang X, Zhang X, Zheng Q (2014) In vitro and in vivo assessment of the biocompatibility of an Mg-6Z(n) alloy in the bile. J Mater Sci Mater Med. 25(2):471-480.

Cipriano AF, Sallee A, Guan RG, Zhao ZY, Tayoba M, Sanchez J, Liu H (2015) Investigation of magnesium-zinc-calcium alloys and bone marrow derived mesenchymal stem cell response in direct culture. Acta Biomater. 12:298-321.

Farraro KF, Kim KE, Woo SL, Flowers JR, McCullough MB (2014) Revolutionizing orthopaedic biomaterials: The potential of biodegradable and bioresorbable magnesium-based materials for functional tissue engineering. J Biomech. 47(9):1979-1986.

Fielding GA, Smoot W, Bose S (2014) Effects of SiO2, SrO, MgO, and ZnO dopants in tricalcium phosphates on osteoblastic Runx2 expression. J Biomed Mater Res A. 102(7):2417-2426.

Fischer J, Kolk A, Wolfart S, Pautke C, Warnke PH, Plank C, Smeets R (2011) Future of local bone regeneration – Protein versus gene therapy. Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery. 39(1):54–64.

Fischer J, Pröfrock D, Hort N, Willumeit R, Feyerabend F (2012) Improved cytotoxicity testing of magnesium materials. Materials Science and Engineering: B. 176(11):830–834.

Fischer J, Prosenc MH, Wolff M, Hort N, Willumeit R, Feyerabend F (2010) Interference of magnesium corrosion with tetrazolium-based cytotoxicity assays. Acta Biomater. 6(5):1813-1823.

Hong D, Saha P, Chou DT, Lee B, Collins BE, Tan Z, Dong Z, Kumta PN (2013) In vitro degradation and cytotoxicity response of Mg-4% Zn-0.5% Zr (ZK40) alloy as a potential biodegradable material. Acta Biomater. 9(10):8534-8547.

Hornberger H, Virtanen S, Boccaccini AR (2012) Biomedical coatings on magnesium alloys - a review. Acta Biomater. 8(7):2442-2455.

Jung O, Smeets R, Porchetta D, Kopp A, Ptock C, Müller U, Heiland M, Schwade M, Behr B, Kröger N, Kluwe L, Hanken H, Hartjen P (2015) Optimized in vitro procedure for assessing the cytocompatibility of magnesium-based biomaterials. Acta Biomater.

Kolk A, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Blessmann M, Heiland M, Wolff K-D, Smeets R (2012) Current trends and future perspectives of bone substitute materials – From space holders to innovative biomaterials. Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery. 40(8):706– 718.

Lock JY, Wyatt E, Upadhyayula S, Whall A, Nunez V, Vullev VI, Liu H (2014) Degradation and antibacterial properties of magnesium alloys in artificial urine for potential resorbable ureteral stent applications. J Biomed Mater Res A. 102(3):781-792.

Lysaght MJ, Jaklenec A, Deweerd E (2008) Great expectations: private sector activity in tissue engineering, regenerative medicine, and stem cell therapeutics. Tissue Eng Part A. 14(2):305-315.

Mason C (2007) Regenerative medicine. The industry comes of age. Med Device Technol. 18(2):25-30.

Ng WF, Chiu KY, Cheng FT (2010) Effect of pH on the in vitro corrosion rate of magnesium degradable implant material. Material Science and Engineering C. 30:898-903.

Park JW, Ko HJ, Jang JH, Kang H, Suh JY (2012) Increased new bone formation with a surface magnesium-incorporated deproteinized porcine bone substitute in rabbit calvarial defects. J Biomed Mater Res A. 100(4):834-840.

Polykandriotis E, Popescu LM, Horch RE (2010) Regenerative medicine: then and now--an update of recent history into future possibilities. J Cell Mol Med. 14(10):2350-2358.

Robinson DA, Griffith RW, Shechtman D, Evans RB, Conzemius MG (2010) In vitro antibacterial properties of magnesium metal against Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. Acta Biomater. 6(5):1869-1877.

Smeets R, El-Moawen A, Jung O, Hanken H, Hartjen P, Heiland M, Kansy K, Kloss F, Kolk A (2014a) From bench to application: current practices in tissue engineering and its realisation at maxillofacial units in Germany, Austria and Switzerland. J Craniomaxillofac Surg. 42(7):1128-1132.

Smeets R, Hanken H, Jung O, Rothamel D, Handschel J, Al-Dam A, Blessmann M, Heiland M, Kolk A (2014b) Knochenersatzmaterialien-Aktueller Stand und ein Ausblick in die Zukunft. Der MKG-Chirurg. 7:53-67.

Smeets R, Jung O, Hanken H, Hartjen P, Al Dam A, Gröbe A, Heiland M, Gosau M, Rothamel D, Schlee M, Iglhaut G, Kolk A (2014c) Was können regenerative Materialien in der Zahnmedizion leisten - und wo sind die Grenzen. Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift. 69:708-721.

Song G, Atrens A (2003) Understanding Magnesium Corrosion. Advances Engineering Materials. 5(12):837-858.

Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J, Dias G (2006) Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review. Biomaterials. 27(9):1728-1734.

Tie D, Feyerabend F, Muller WD, Schade R, Liefeith K, Kainer KU, Willumeit R (2013) Antibacterial biodegradable Mg-Ag alloys. Eur Cell Mater. 25:284-298; discussion 298.

Walker J, Shadanbaz S, Kirkland NT, Stace E, Woodfield T, Staiger MP, Dias GJ (2012) Magnesium alloys: predicting in vivo corrosion with in vitro immersion testing. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 100(4):1134-1141.

Wang J, Tang J, Zhang P, Li Y, Wang J, Lai Y, Qin L (2012) Surface modification of magnesium alloys developed for bioabsorbable orthopedic implants: a general review. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 100(6):1691-1701.

Wang J, Witte F, Xi T, Zheng Y, Yang K, Yang Y, Zhao D, Meng J, Li Y, Li W, Chan K, Qin L (2015) Recommendation for modifying current cytotoxicity testing standards for biodegradable magnesium-based materials. Acta Biomater. 21:237-249.

Wang YB, Xie XH, Li HF, Wang XL, Zhao MZ, Zhang EW, Bai YJ, Zheng YF, Qin L (2011) Biodegradable CaMgZn bulk metallic glass for potential skeletal application. Acta Biomater. 7(8):3196-3208.

Witte F (2010) The history of biodegradable magnesium implants: a review. Acta Biomater. 6(5):1680-1692.

Witte F, Kaese V, Haferkamp H, Switzer E, Meyer-Lindenberg A, Wirth CJ, Windhagen H (2005) In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. Biomaterials. 26(17):3557-3563.

Xin Y, Hu T, Chu PK (2011a) Degradation behaviour of pure magnesium in simulated body fluids with different concentrations of HCO<sub>3</sub>-. Corrosions Science. 53:1522-1528.

Xin Y, Hu T, Chu PK (2011b) In vitro studies of biomedical magnesium alloys in a simulated physiological environment: a review. Acta Biomater. 7(4):1452-1459.

Yang J, Cui F, Lee IS (2011) Surface modifications of magnesium alloys for biomedical applications. Ann Biomed Eng. 39(7):1857-1871.

# Postervorträge im Rahmen der Dissertation

**Ole Jung**, Philip Hartjen, Henning Hanken, Alexander Kopp; Christoph Ptock, Max Schwade, Max Heiland, Ralf Smeets: Entwicklung eines bioresorbierbaren Magnesiumimplantats für individuelle Kontinuitätsdefekte des Knochens (11. Hamburger Studententagung zur Innovativen Medizin- und Biotechnologie 2014, Hamburg)

**Ole Jung**, Philip Hartjen, Henning Hanken, Alexander Kopp; Christoph Ptock, Max Heiland, Ralf Smeets: Development of a bioresorbable magnesium implant for individual bone defects (MOSA Conference 2014, Maastricht; Gewinner KNMG Award)

# Vorträge im Rahmen der Dissertation (als Vortragender)

**Ole Jung**, Henning Hanken, Max Heiland, Christoph Ptock, Max Schwade, Alexander Kopp, Philip Hartjen, Ralf Smeets: Entwicklung von bioresorbierbaren Magnesiumimplantaten für individuelle Kontinuitätsdefekte in der MKG-Chirurgie (Deutsche Physikalische Gesellschaft -Frühjahrstagung 2015, Berlin)

**Ole Jung**, Philip Hartjen, Henning Hanken, Alexander Kopp; Christoph Ptock, Max Heiland, Ralf Smeets: Development of resorbable magnesium implants for the treatment of individual bone defects in oral and maxillofacial surgery (BioMat 2015, Weimar)

**Ole Jung**, Ralf Smeets, Philip Hartjen, Henning Hanken, Alexander Kopp, Christoph Ptock, Max Schwade, Max Heiland: Individuelle resorbierbare Magnesiumimplantate zur Rekonstruktion von knöchernen Defekten im Kopf-/Halsbereich – eine in vitro Analyse (65. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie 2015, Stuttgart)

**Ole Jung**: Entwicklung keramisierter und submillimeter strukturierter degradierbarer Magnesiumimplantate für die knöcherne Rekonstruktion (Werkstoffwoche 2015, Dresden)

# Preise im Rahmen der Dissertation

 2014: KNMG Award der "Royal Dutch Medical Association", Mosa Conference, Maastricht, Niederlande • 2015: 1. Platz "Schaulaufen der Talente-Werkstoffe für die Zukunft", Werkstoffwoche, Dresden

# Erklärung des Eigenanteils an der Publikation

Mein Anteil der vorliegenden Arbeit definiert sich unter anderem an der eigenständigen Entwicklung der Frage- und Problemstellungen. Die Herstellung und Beschichtung der Prüfmuster sowie die elektrochemischen Messungen und Bildaufnahmen (REM/EDX, Profilometrie) wurden unter meiner Mitarbeit in Aachen bei der Firma Meotec GmbH & Co. KG bewerkstelligt. Die Planung und Durchführung der übrigen Experimente, Methoden sowie Literaturrecherche wurde von mir selbstständig am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Nach Auswertung des Datenmaterials durch meine Person erfolgte die Interpretation aller jeweils gewonnenen Daten in enger Abstimmung mit Dr. rer. nat. Philip Hartjen. Bis auf die Bildaufnahmen REM/EDX und Profilometrie wurden sämtliche Abbildungen und Diagramme von mir erstellt. Das Verfassen des Manuskripts inklusive Beschreibung von Diagrammen und Abbildungen erfolgte in gemeinschaftlicher Arbeit mit Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Ralf Smeets, Dr. med. Dr. med. dent. Henning Hanken und Dr. rer. nat. Philip Hartjen. Die Co-Autoren unterstützten das Projekt zu gleichen Teilen im Rahmen der Planungs- und Laborphase.

# Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Ralf Smeets für das langjährige Vertrauen, die Unterstützung und die großartige Förderung, wodurch die vorliegende Arbeit in der bestehenden Form überhaupt erst ermöglicht wurde. Für auftretende Probleme und Schwierigkeiten konnte er immer wieder Lösungsansätze aufzeigen, welche die vorliegende Arbeit beeinflusst und meinen beruflichen Werdegang entscheidend geprägt haben.

Ich danke Dr. rer. nat. Philip Hartjen und Dr. med. Dr. med. dent. Henning Hanken als Mitglieder unserer Forschungsgruppe für die longitudinale und hervorragende Betreuung.

Dr.-Ing. Ute Müller danke ich zutiefst für die Hinweise, das Vertrauen und das Beibringen der grundlegenden Techniken um die Zytokompatibilitätsanalyse. Ohne die freundschaftliche Zusammenarbeit wären die vorliegenden Ergebnisse nicht zustande gekommen.

Alexander Kopp, Christoph Ptock, Dario Porchetta sowie allen Mitarbeitern der Firma Meotec GmbH & Co. KG danke ich für die hervorragende Mitarbeit, Ideenentwicklung und Unterstützung, welche die Basis der vorliegenden Arbeit entscheidend geprägt haben.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meinem Freund und Firmenpaten Harald, für die Ratschläge, Gespräche und die schönen Momente. Meiner Cousine Cosima danke ich für die Unterstützung bei der Überarbeitung des vorliegenden Werkes.

Meiner Tochter Greta danke ich für das Verständnis, dass Papa oft erst spät von der Arbeit nach Hause kommen kann.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die immerwährende großartige Unterstützung über die Jahre des Studiums. Ihnen und meiner Tochter widme ich diese Arbeit.

# Lebenslauf

Name	Ole Jung
Geburtsdatum	11.10.1987
Familienstand	ledig, 1 Tochter
•	Schulische Laufbahn
08.1994-06.2004	Grundschule, Orientierungsstufe, Gymnasium, Katholische Privatschule St. Johannis, Bremen
08.2004-06-2007	Gymnasiale Oberstufe Obervieland, Bremen
06.2007	Allgemeine Hochschulreife, Note: 1,5
•	Studium
06.2007-03.2008	Forschungsaufenthalt und Pflegepraktikum in den USA und Deutschland
03.2008-11.2014	Studium der Humanmedizin an den Universitäten Hamburg und Private Universität Witten/Herdecke mit Auslandsaufenthalten in den USA, Polen England Schweiz
10 2014-11 2014	Staatsevamen Humanmedizin, Note: 1.7
12 2014	Approhistion als Arzt
12.2014	
*	Studienbegleitende Tätigkeiten
04.2008-09.2012	Wissenschaftlicher studentischer Mitarbeiter, Institut für Ethik und Kommunikation im Gesundheitswesen, Private Universität Witten/Herdecke
10.2010-10.2013	Forschungsarbeiten, Institut für Gesundheitssystemforschung, Private Universität Witten/Herdecke
10.2012-12.2014	Dissertationsarbeiten und wissenschaftlicher studentischer Mitarbeiter, Klinik- und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
•	Berufliche Laufbahn
Seit 01.2015	Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Assistenzarzt, Klinik- und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf
•	Stipendien, Preise und Auszeichnungen
Schule	1.Preis Jugendschreibwettbewerb Bremen und "Bremen gegen Rassismus"
Studium	Studienstipendien der Studienstiftung des Deutschen Volkes, MLP "Medical Excellence" und "e-fellows"
2011	Buchpreis MLP "Medical Excellence"
2014	KNMG Award, Mosa Conference, Maastricht, Niederlande
0045	

2015 1. Platz "Schaulaufen der Talente-Werkstoffe für die Zukunft", Werkstoffwoche, Dresden

# Publikationsverzeichnis (chronologisch, Jahr absteigend)

**Jung O**, Smeets R, Porchetta D, Kopp A, Ptock C, Müller U, Heiland M, Schwade M, Behr B, Kröger N, Kluwe L, Hanken H, Hartjen P. *Optimized in vitro procedure for assessing the cytocompatibility of magnesium-based biomaterials*. Acta biomaterialia. 2015.

Al-Zer H, Apel C, Heiland M, Friedrich RE, **Jung O**, Kroeger N, Kroeger N, Smeets R. *Enrichment and Schwann Cell Differentiation of Neural Crest-derived Dental Pulp Stem Cells*. In Vivo. 2015;29(3):319-26.

Smeets R, Hanken H, **Jung O**, Heiland M. *Future Perspectives of Bisphosphonates in Maxillofacial, Dental, and Medical Practice*. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws. Berlin Heidelberg: Springer; 2015. p. 207-15. (Buchkapitel)

Smeets R, **Jung O**, Hanken H, Hartjen P, Al Dam A, Gröbe A, Heiland M, Gosau M, Rothamel D, Schlee M, Igelhaut G, Kolk A. *Was können regenerative Materialien in der Zahnmedizion leisten - und wo sind die Grenzen*?. Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift. 2014;69:708-21.

Smeets R, Henningsen A, **Jung O**, Heiland M, Hammacher C, Stein JM. *Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis--a review*. Head Face Med. 2014;10:34.

Smeets R, El-Moawen A, **Jung O**, Hanken H, Hartjen P, Heiland M, Kansy K, Kloss F, Kolk A. *From bench to application: current practices in tissue engineering and its realisation at maxillofacial units in Germany, Austria and Switzerland*. Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery. 2014;42(7):1128-32

Smeets R, Hanken H, **Jung O**, Rothamel D, Handschel J, Al-Dam A, Blessmann M, Heiland M, Kolk A. *Knochenersatzmaterialien-Aktueller Stand und ein Ausblick in die Zukunft*. Der MKG-Chirurg. 2014;7:53-67.

Hanken H, Alpers J, Bobel M, Wöltje M, Hartjen P, Friedrich RE, **Jung O**, Rendenbach C, Gröbe A, Heiland M, Al Dam A, Eichhorn W, Smeets R. *Bone substitutes enhance osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in three-dimensional scaffolds*. In Vivo. 2014;28(5):733-9.

**Jung O**, Hanken H, Smeets R, Hartjen P, Friedrich RE, Schwab B, Gröbe A, Heiland M, Al Dam A, Eichhorn W, Sehner S, Kolk A, Wöltje M, Stein JM. *Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in fibrin-hydroxyapatite matrix in a 3-dimensional mesh scaffold*. In Vivo. 2014;28(4):477-82.

Geraedts M, Malik M, **Jung O**, de Cruppe W. [*Breast cancer centres in North Rhine-Westphalia - case volume trends 2004-2010*]. Gesundheitswesen. 2013;75(7):424-9.

Geraedts M, Malik M, **Jung O**, de Cruppe W. *Brustkrebszentren in Nordrhein-Westfalen - Fallzahlentwicklung 2004-2010*. Senologie. 2013;10(01):39-44.

Bremen, den 08.10.2015, Ole Jung

# **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....