

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Entwicklung und in vitro-Prüfung von
Implantatkonstrukten für kritische Defekte im
Schädelbereich**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer Doktorin
der Veterinärmedizin
- Doctor medicinae veterinariae -
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von
Julia Matena
Köln

Hannover 2015

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Ingo Nolte
Klinik für Kleintiere

PD Dr. Hugo Murua Escobar

1.Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Ingo Nolte
Klinik für Kleintiere

2.Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Wolfgang Baumgärtner
Institut für Pathologie

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2015

Die hier vorliegende Arbeit entstand im Rahmen eines durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, NO 299/11-1) geförderten Projekts und in Assoziation mit dem Sonderforschungsbereich 599 (SFB 599). Sie wurde unterstützt durch ein Stipendium des Graduiertenkollegs Biomedizintechnik des SFB 599 und der Hannoverschen Gesellschaft zur Förderung der Kleintiermedizin e.V. (HGFK).

Meiner Familie

Teile dieser Dissertation wurden bei folgenden Fachzeitschriften veröffentlicht:

Biomedical engineering / Biomedizinische Technik (am 07.09.2013 veröffentlicht)

Characterisation of Cell Growth on Titanium Scaffolds Made by Selective Laser Melting for Tissue Engineering

Nummer 67. doi: 10.1515/bmt-2013-4047

PMID: 24042642

Julia Matena, Matthias Gieseke, Andreas Kampmann, Svea Petersen, Hugo Murua Escobar, Katrin Sternberg, Heinz Haferkamp, Nils-Claudius Gellrich, Ingo Nolte

International Journal of Molecular Sciences (am 02.04.2015 veröffentlicht)

16(4):7478-92. doi: 10.3390/ijms16047478

PMID: 25849656

SLM reduced Porous Titanium Implant Improvements for Enhanced Vascularization and Osteoblast Seeding

Julia Matena, Svea Petersen, Matthias Gieseke, Andreas Kampmann, Michael Teske, Martin Beyerbach, Hugo Murua Escobar, Heinz Haferkamp, Nils-Claudius Gellrich, Ingo Nolte

Folgendes Manuskript ist zur Einreichung vorbereitet:

International Journal of Molecular Sciences:

PCL and P(3HB) Coating for Functionalization of Selective Laser Melted Titanium and Magnesium Scaffolds

Julia Matena, Svea Petersen, Matthias Gieseke, Pooyan Alouis, Michael Teske, Günter Reuter, Martin Beyerbach, Andreas Kampmann, Hugo Murua Escobar, Nils-Claudius Gellrich, Heinz Haferkamp, Ingo Nolte

Teilergebnisse dieser Dissertation wurden bei folgenden Fachkongressen als Vortrag präsentiert:

9. ThGOT / 9. Biomaterial-Kolloquium (am 05.09.13 in Zeulenroda)

Julia Matena, Matthias Gieseke, Andreas Kampmann, Svea Petersen, Hugo Murua Escobar, Katrin Sternberg, Nils-Claudius Gellrich, Heinz Haferkamp, Ingo Nolte
Verbesserte Oberflächenstrukturierung zum Einwachsen von Osteoblasten

Biomedizinische Technik (BMT) (am 19.09.13 in Graz)

Julia Matena, Matthias Gieseke, Andreas Kampmann, Svea Petersen, Hugo Murua Escobar, Katrin Sternberg, Heinz Haferkamp, Nils-Claudius Gellrich, Ingo Nolte
Characterisation of Cell Growth on Titanium Scaffolds Made by Selective Laser Melting for Tissue Engineering

DVG-Vet-Congress, DVG-Fachgruppe Chirurgie (am 08.11.13 in Berlin)

Julia Matena, Matthias Gieseke, Andreas Kampmann, Svea Petersen, Hugo Murua Escobar, Katrin Sternberg, Nils-Claudius Gellrich, Heinz Haferkamp, Ingo Nolte
Patientenindividuelle Titanimplantate Mittels Selective Laser Melting (SLM)

KMM-VIN 2nd Industrial Workshop on "Current Research, Industrial and Clinical Issues in Bone Implant Development" (am 21.05.14 in Bremen; Einladung)

Julia Matena

Biocompatibility studies on porous magnesium and titanium implants using different polymer coatings for bone tissue engineering

Biomedizinische Technik (BMT) (am 10.10.14 in Hannover)

Julia Matena, Matthias Gieseke, Andreas Kampmann, Svea Petersen, Michael Teske, Hugo Murua Escobar, Nils-Claudius Gellrich, Heinz Haferkamp, Ingo Nolte
Effects of different coatings and proangiogenic factors using titaniumhybrid-implants

2nd International Conference on Predictive, Preventive and Personalized Medicine and Molecular Diagnostics (am 03.11.14 in Las Vegas, USA)

Julia Matena, Matthias Gieseke, Andreas Kampmann, Svea Petersen, Michael Teske, Hugo Murua Escobar, Nils-Claudius Gellrich, Heinz Haferkamp, Ingo Nolte
Patient specific reconstruction of skeletal defects in the maxillo-facial region using magnesium implants produced with Selective Laser Melting (SLM) technique- an in vitro study

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
2	Literaturübersicht	11
2.1	Deckung von Schädeldefekten	11
2.2	Rapid Prototyping und Titan	12
2.3	Rapid Prototyping und resorbierbare Implantate	12
2.4	Magnesium in der Osteosynthese	14
2.5	Polymere als Implantatbeschichtung	15
2.6	In vitro- und in vivo-Zellbesiedlung von Implantaten	15
2.7	Vaskularisation und proangiogene Faktoren	16
3	Studie 1	18
4	Studie 2	20
5	Studie 3	22
6	Diskussion	49
7	Zusammenfassung	56
8	Summary	58
9	Literaturverzeichnis	60
10	Abkürzungsverzeichnis	73
11	Danksagung	75

1 Einleitung

Kritische Schädeldefekte sind häufig Folge ausgedehnter Tumorresektionen, schwerwiegender entzündlicher Prozesse, Folge eines erheblichen Traumas oder kongenital bedingt (CHENARD et al. 2012). Eine adäquate Rekonstruktion eines Defektes gilt heute als kritisch, wenn wegen der Größe und der Lokalisation die Integration des Implantates infolge nicht zeitgerechter Vaskularisation bzw. Osteosynthese nicht gegeben ist (SARAN et al. 2014). Bisheriger Goldstandard zur Rekonstruktion von Schädeldefekten ist der Einsatz von autogenen Knochentransplantaten, welche meist aus dem Hüftkamm des Patienten mobilisiert werden. Allerdings ist oft eine hohe Morbidität des Spendeareals Folge dieser Operationstechnik und die Verfügbarkeit des Materials ist begrenzt (SASSO et al. 2005). Auf Grund der Nachteile autogenen Knochenmaterials wird nach synthetischen Ersatzmaterialien gesucht. Alternative Titanimplantate bieten zwar die nötige Stabilität und Biokompatibilität, jedoch macht das permanente Implantat im Allgemeinen eine erneute Operation mit Implantatentfernung erforderlich (SCHUMANN et al. 2013).

Ziel der vorliegenden Studie ist es, ein für den Schädelknochen konstruiertes, resorbierbares Implantat im Vergleich zu einem nicht resorbierbaren zu prüfen, das direkt nach der Operation lasttragend ist und eine schnelle Vaskularisation und Knochendurchbauung gewährleistet. Geeignete Materialien für Knochendefekte kritischer Größe, welche sowohl stabil als auch resorbierbar sind, wurden bisher noch nicht entwickelt (DAVIES et al. 2010; YANG et al. 2014). Wichtig besonders im Schädelbereich, in dem Form und Größe des Defekts sehr variabel ausfallen, ist eine individuell auf den Patienten angepasste Implantatkontur (ROTARU et al. 2012). Generell eignen sich sogenannte Rapid Prototyping Verfahren zu einem patientenspezifischen Implantataufbau, zu denen das generative Fertigungsverfahren „selektives Laserschmelzen“ (SLM) gehört (ROTARU et al. 2015). Magnesium und seine Verbindungen sind Materialien, welche in den Grundeigenschaften den Anforderungen der Resorbierbarkeit und Stabilität entsprechen (WAIZY et al. 2013; WILLBOLD et al. 2015). So zeigte Magnesium in verschiedenen Studien eine gute Biokompatibilität als Knochenimplantat (WAIZY et al. 2013; CHAYA et al. 2015b).

Magnesium kann mittels SLM verarbeitet werden, allerdings ist der SLM Prozess auf Grund der hohen Reaktivität von Magnesium eine große Herausforderung, welche erst in den letzten Jahren überwunden werden konnte (NG et al. 2010; NG et al. 2011; ZHANG et al. 2012). Das SLM-Verfahren ermöglicht die Herstellung von beliebigen Geometrien. Das erste poröse 3D Konstrukt aus Magnesium wurde im Jahr 2013

mittels SLM konstruiert (JAUER et al. 2013). Seitdem ist der Weg geebnet, ein patientenspezifisches Implantat auch mit diesem Werkstoff herzustellen und zu prüfen.

Da jedoch die Osseointegration von Implantaten in großen, kritischen Defekten wegen des beschränkten Regenerationspotentials oft nicht ausreicht, werden zur Regenerationsförderung verschiedene Möglichkeiten genutzt (HORCH u. PAUTKE 2006; SARAN et al. 2014). So werden z.B. mesenchymale Fettstammzellen zur Prävitalisierung von Implantatmaterialien genutzt (COWAN et al. 2004). Vorteil von Fettstammzellen ist neben der Potenz zur osteogenen Differenzierung eine schnelle und minimalinvasive Verfügbarkeit durch Isolation aus dem körpereigenen Fettgewebe bei hoher Zellzahl (COWAN et al. 2004; BAER u. GEIGER 2012).

Das Verhalten der Zellen kann unter verschiedenen Einflüssen in vitro geprüft werden, um z.B. eine Auswahl der möglichen Implantatmaterialien und -strukturen zu treffen. Die in vitro-Untersuchung der Zellen auf den zu testenden Materialien wird daher möglichst nahe an den in vivo-Bedingungen durchgeführt, um eine effiziente Übertragung der in vitro-Ergebnisse zu erreichen. Die bisherigen Arbeiten zur Visualisierung von Zellen auf Implantaten beziehen sich überwiegend auf histologische Auswertungen, welche damit nur einen Zeitpunkt des Zellverhaltens erfassen können (COWAN et al. 2004; LEVI et al. 2010). Eine dynamische Untersuchung über die Zeit ist dagegen mittels Live Cell Imaging (LCI) möglich, welches auch in der vorliegenden Studie angewendet wurde.

Da das Zellwachstum und auch die Vaskularisation von der Oberflächenstruktur und Geometrie der Implantate abhängt, muss dies bei der Konstruktion berücksichtigt werden (DRUECKE et al. 2004; SHEN et al. 2015). Insbesondere bei großen Knochendefekten, ist eine frühe Vaskularisation für einen ausreichenden Stoffaustausch sehr wichtig (MULLER et al. 2010). Um das Einsprossen von Kapillaren zu fördern, kann das Implantat z.B. eine Gitterstruktur erhalten. Eine Porengröße von 250 µm ist nach Ergebnissen aus der Literatur proangiogen (ARTEL et al. 2011). Entsprechend ist die Hypothese, dass offenporige Magnesiumkonstrukte für die Behandlung von Knochendefekten gute Voraussetzungen bieten (WITTE et al. 2007a; WITTE et al. 2007b). Allerdings sind derart feine Strukturen mit Magnesium und seinen Legierungen eine produktionstechnische Herausforderung. Um die Eignung solcher Geometrien zu prüfen, wurde bisher eine Titanlegierung (TiAl6V4) verwendet, die sowohl als Implantatwerkstoff, als auch für die Verarbeitung mittels SLM Verfahren geeignet ist (VAN BAEL et al. 2012). Eine ausreichende Stabilität für den Einsatz in Knochendefekten lag bei SLM-generierten Titanimplantaten mit 230 µm Porengröße vor (VAN DER STOK et al. 2013a).

Zur weiteren Förderung der Vaskularisation eines Implantates können proangiogene Faktoren verwendet werden (LINDHORST et al. 2010). Um diese in ausreichender

Menge und lokal im Knochendefekt freizusetzen, können sie beispielsweise in ein Polymer inkorporiert werden (DE GIGLIO et al. 2010; FU et al. 2014). Das Polymer wird dazu als Überzug auf das Implantat verbracht und die Faktoren können dann während der Degradation des Polymers freigesetzt werden (DE GIGLIO et al. 2010). Zusätzlicher Effekt der Polymerbeschichtung ist ggf. ein Korrosionsschutz für das Magnesium. Die Korrosionsgeschwindigkeit kann grundsätzlich durch die Art der Legierung oder durch eine Beschichtung mit einem geeigneten Polymer angepasst werden (SHADANBAZ et al. 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte zur Versorgung eines kritischen Schädeldefektes im Rahmen von 3 Teilabschnitten in in vitro-Studien untersucht.

1. In der ersten Studie wurde die offenporige Implantatgeometrie zunächst mit dem Titanwerkstoff hinsichtlich der Zellbiokompatibilität überprüft, da eine Herstellung mit Magnesium zu diesem Zeitpunkt noch nicht etabliert war. Die Visualisierung von Zellen wurde entsprechend einer in vivo nahen Untersuchung mittels LCI angepasst. Die Faktoren Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und High-Mobility-Group-Protein B1 (HMGB1) wurden auf ihr proangiogenes Potential getestet, sowie auf ihren Einfluss gegenüber osteogenen Zellen.

2. Das offenporige Titanimplantat aus Studie 1 wurde vergleichend mit und ohne Polymerbeschichtung (Polycaprolacton, PCL) geprüft. Hierzu wurden Osteoblasten auf den verschiedenen Implantaten mit dem LCI untersucht. Eine histologische Untersuchung der Zellbesiedlung im Inneren der Titanimplantatstruktur ergänzte die Ergebnisse aus dem LCI. Verschiedene Faktoren (VEGF, HMGB1 und CXCL12) wurden auf ihr chemotaktisches Potential gegenüber Endothelzellen untersucht, welche für die Funktionalisierung der Polymerbeschichtung vorgesehen sind.

3. Der Einfluss polymerbeschichteter Titanimplantate (PCL und Polyhydroxybutyrat, P(3HB)) auf Osteoblasten und mesenchymale Stammzellen wurde mit dem LCI untersucht. Zusätzlich wurde das Zellverhalten auf den Polymeren im Vitalitäts-, Proliferationsassay und mittels Single Cell Force Spectroscopy (SCFS) verglichen. Die Polymerbeschichtungen auf den Titanimplantaten wurden mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) und spezieller Rasterelektronenmikroskopie (ESEM) und auf eine vollständige Beschichtung überprüft. Magnesium konnte über das SLM Verfahren als flache Struktur auf eine Titgrundplatte aufgetragen werden und mit dem zuvor ermittelten Polymer beschichtet werden (Magnesiumhybridkonstrukt). Korrosionsstudien vervollständigten die Untersuchung der Polymerbeschichtung. Ein Magnesiumkonstrukt mit vereinfachter Porenstruktur konnte generiert werden.

Die Ergebnisse aus diesen in vitro-Untersuchungen sollen als Grundlage für weitere tierexperimentelle Untersuchungen dienen.

2 Literaturübersicht

2.1 Deckung von Schädeldefekten

Als Goldstandard zur Deckung knöcherner Defekte im Schädelbereich gilt der Einsatz von autologem Knochen. Trotz vieler Limitationen wie Morbidität des Lagerknochens, begrenzte Materialverfügbarkeit und verlängerte Operationszeit überwiegen grundsätzlich die Vorteile, welche durch Vaskularisation und Osseointegration des autologen Knochenmaterials erreicht werden (ROGERS u. GREENE 2012). Um die Nachteile, die dem autologen Knochen anhaften, zu umgehen, werden verschiedene Implantatmaterialien eingesetzt, wobei keines bisher den Anforderungen im Schädelbereich gerecht geworden ist (SCOLOZZI 2012). Da permanente Implantate eine erneute Operation zur Entfernung als Folge haben können, sind resorbierbare Implantate in den Focus der biomedizinischen Forschung gerückt. Die Vielzahl der verschiedenen resorbierbaren Materialien unterstreicht jedoch die Limitationen der einzelnen (LAURENCIN et al. 2006).

Resorbierbares, allogenes Material umgeht zwar einen Teil der Nachteile des autologen Materials, indem ein Kadaverknochen den aus dem Patienten entnommenen Knochen ersetzt, birgt aber das Risiko von Infektionen und Abstoßung (LAURENCIN et al. 2006). Resorbierbare Polymere wie Polyglycolsäure (PGA), Polylactid (PLA), und Polylactid-co-Glykolid (PLGA) sind zwar leicht zu verarbeiten, können jedoch durch Bulk-Erosion, welche in vivo vorkommt, Fremdkörperreaktionen hervorrufen (PILIPCHUK et al. 2015). Im Gegensatz zu den geringeren mechanischen Eigenschaften von Polymeren, sind resorbierbare Keramiken wie Hydroxyapatit, bioaktives Glas und beta-Tricalcium Phosphat zumeist zwar stabiler, allerdings durch Ihre geringe Ermüdungsbeständigkeit und hohe Fragilität nur für nicht oder gering lasttragende Bereiche geeignet (FU et al. 2008; PILIPCHUK et al. 2015).

Auf Grund der genannten Nachteile geprüfter resorbierbarer Materialien, allem voran wegen der geringen Stabilität, sind permanente Titanimplantate derzeit Mittel der Wahl. Sie werden als Titannetz angewendet (LUO et al. 2012). Allerdings wirken sich bei deren Verwendung die Nachteile des permanenten Materials aus. Bei Komplikationen wie Infektionen, Dislokation, Wund-Dehiszenz, oder Wachstumsstörung im pädiatrischen Bereich, muss das Implantat wieder entfernt werden (SCHUMANN et al. 2013).

Permanente Implantate wie Titan werden nicht nur auf Grund der mechanischen Stabilität häufig eingesetzt, sondern auch wegen der Möglichkeit der Herstellung von patientenspezifischen Implantaten (SCHUMANN et al. 2013; ROSENTHAL et al. 2014; SHAH et al. 2014). In der letzten Zeit hat ein Trend zu patientenindividuellen

Implantaten eingesetzt (LETHAUS et al. 2014). Gerade im Schädelbereich sind Knochendefekte sehr heterogen hinsichtlich ihrer Kontur, Form und Größe. Daher sind patientenindividuelle Implantate von großer Bedeutung, welche durch ihre hohe Passgenauigkeit sowohl die Operationszeit reduzieren, als auch in ästhetischer Hinsicht ein gutes Ergebnis erzielen (ROTARU et al. 2015). Mittels CT-Aufnahmen wird der Knochendefekt exakt dargestellt. Diese Daten werden mit einem speziellen Computerprogramm berechnet und die Implantatgeometrie ermittelt (Computer Aided Design). Anschließend wird die errechnete Geometrie für die patientenindividuelle Implantatherstellung genutzt, wobei die Herstellung über ein Rapid Prototyping Verfahren erfolgt (Computer Aided Manufacturing) (ROTARU et al. 2012).

2.2 Rapid Prototyping und Titan

Titan besitzt eine hohe Stabilität, welche jedoch nicht mit der Stabilität von Knochen übereinstimmt. Das Elastizitätsmodul von Titan ist im Vergleich zu kortikalem Knochen etwa 6 Mal höher (NIINOMI 1998). Dies kann zu einer verminderten Lastübertragung vom Implantat auf den Knochen führen, sodass der Knochen atrophiert und eine Implantatlockerung erfolgt (stress-shielding) (EL-HAJJE et al. 2014). Um die Steifigkeit von Titan anzupassen, kann eine poröse Titanimplantatstruktur genutzt werden, welche an die mechanischen Eigenschaften von Knochen angepasst ist (ZHU et al. 2007). Weiterer Vorteil der Porenstruktur ist eine verbesserte Integration in das umliegende Knochengewebe durch eine Verankerung des Knochens in die Poren (RYAN et al. 2006). Es gibt viele verschiedene Verfahren, um poröse Titanimplantate herzustellen, wobei Porenstrukturen mit und ohne Konnektivität unterschieden werden (RYAN et al. 2006). Das Rapid Prototyping bietet den Vorteil, die gewünschte Porenstruktur mit verschiedenen Methoden, wie SLM, Electron Beam Melting (EBM), Laser engineered net Shaping (LENS) und 3D Druck herzustellen (EL-HAJJE et al. 2014). Daraus ergibt sich eine gute Osseointegration des porösen Titanimplantats mit einem den Knochen angepassten Elastizitätsmodul (WIEDING et al. 2015). Es bleiben jedoch die Nachteile eines permanenten Implantats, das zumindest nach Komplikationen über erneute Operation entfernt werden muss (SCHUMANN et al. 2013).

2.3 Rapid Prototyping und resorbierbare Implantate

Ziel der Verwendung von resorbierbaren Implantaten ist eine zeitangepasste Resorption des Materials nach ausreichendem Knochenaufbau (ERDMANN et al. 2011; YUSOP et al. 2012). Der neugebildete Knochen soll mit Hilfe des Implantats als Leitschiene wachsen können. Das resorbierbare Implantat wirkt temporär

stabilisierend und wird anschließend resorbiert. Um dies zu ermöglichen, werden auch für die resorbierbaren Implantate poröse Strukturen genutzt (YUSOP et al. 2012).

Polymere, Keramiken und Metalle sind die drei Hauptgruppen der zurzeit untersuchten resorbierbaren Implantatmaterialien (TAN et al. 2013). Verschiedene Materialien werden bereits im Rapid Prototyping Verfahren mit einer porösen Struktur hergestellt. Keramiken, wie Calciumphosphat und Calciumsulfat, können beispielsweise über 3D Pulverdruck hergestellt werden. Sie erfüllen aber oft nicht die mechanischen Voraussetzungen aufgrund allgemein geringer Bruchzähigkeit. Durch Hitzebehandlung kann die Stabilität erhöht werden, jedoch beschränkt sich der Einsatz dieser Implantate auf geringe lasttragende Bereiche (KLAMMERT et al. 2010; EL-GHANNAM et al. 2013; FARZADI et al. 2014). Resorbierbare Polymere wie PCL können auch über 3D Druck gefertigt werden. Es fehlt jedoch eine ausreichende Stabilität für den Ersatz eines Knochendefektes (SKARDAL u. ATALA 2014). Obwohl mittels 3D Druck Verfahren keine stabilen resorbierbaren Materialien für den Knochenbereich hergestellt werden können, bietet es die Möglichkeit der Inkorporation von lebenden Zellen oder Wachstumsfaktoren während des Druckverfahrens und ist somit für die nicht lasttragenden Knochenbereiche geeignet (WUST et al. 2014). 2-Photonen-Polymerisation (2PP) ist ein hochpräzises Rapid Prototyping Verfahren, welche die Verwendung von verschiedenen Materialien ermöglicht wie PCL und Polylactid (PLA). Jedoch ist die lange Prozessdauer limitierend und somit nur für die Herstellung kleiner Implantate geeignet (GITTARD et al. 2013). Ein weiteres Verfahren, das die Herstellung offenporiger Implantate aus Polymeren wie PCL ermöglicht, ist das Fused Deposition Modeling (FDM) (ROHNER et al. 2003).

Aufgrund der geringen Stabilität der resorbierbaren Polymer- oder Keramikimplantate konnte bisher kein resorbierbares Implantat für den Einsatz bei großen Defekten im lasttragenden Knochen über ein Rapid Prototyping Verfahren hergestellt werden. Insbesondere die schlechten mechanischen Eigenschaften der Polymere und Keramiken haben dazu geführt, dass resorbierbare Metalle in den Focus gerückt sind (YUSOP et al. 2012). Magnesium und Eisen sowie deren Legierungen wurden in der Biomedizintechnik untersucht. Magnesium wird auf Grund der ähnlichen mechanischen Eigenschaften von Knochen als zukunftsfähiges resorbierbares Implantat herausgehoben (YUSOP et al. 2012). Es zeigte eine gute Biokompatibilität als Implantatwerkstoff (WAIZY et al. 2013). Nichtsdestotrotz kann die unkalkulierbare Korrosionsgeschwindigkeit und die damit verbundene Wasserstoffbildung zu Störungen wie ein erniedrigter Knochen-Implantat-Kontakt führen. Magnesiumlegierungen oder auch Beschichtungen sollen die Korrosionsgeschwindigkeit herabsetzen (SHADANBAZ et al. 2014).

Offenporige Magnesiumimplantate mit definierter Porenstruktur können durch mechanische Perforation eines Grundkörpers über ein laserbasiertes Verfahren hergestellt werden, wobei die Geometrie beschränkt ist (TAN et al. 2009). Eine Herstellungsmethode, welche beliebige Geometrien ermöglicht, wird als neue Solid Freeform Fabrication (SFF)-Methode beschrieben. Nachteilig sind mögliche prozessbedingte Natriumchlorid-Rückstände, welche zu einer erhöhten Korrosionsrate führen (NGUYEN et al. 2011).

Trotz der hohen Reaktivität von Magnesium gelang es kürzlich über das SLM Verfahren ein offenporiges Konstrukt herzustellen (JAUER et al. 2013). Neben der hohen Herstellungsgeschwindigkeit und der Produktion beliebiger Geometrien benötigt das SLM Verfahren keine zusätzlichen Fremdstoffe zur Herstellung, sodass ein hochreines Implantat produziert werden kann ohne die Gefahr von Rückständen aus der Prozesskette (SAVALANI et al. 2010).

2.4 Magnesium in der Osteosynthese

Das Elastizitätsmodul von Magnesium liegt im Bereich des körpereigenen Knochens und ist somit als einziges bekanntes biodegradables Material mit dieser mechanischen Eigenschaft als Implantatwerkstoff von medizinischem Interesse (ERDMANN et al. 2011). Zwar ist reines Magnesium schon Anfang des 20. Jahrhunderts als Implantatwerkstoff untersucht worden, jedoch wurde Magnesium erst wieder geprüft, nachdem der technische Fortschritt Oberflächenmodifikation und Magnesiumlegierungen ermöglichte, welche die Stabilität verbessern und die massive Gasproduktion in Folge der Korrosion verringern konnte (XU et al. 2007).

Eine gute Biokompatibilität von Magnesium wurde bereits in vielen Studien nachgewiesen, wie beispielsweise in den Arbeiten des Sonderforschungsbereichs 599 (BONDARENKO et al. 2011; SCHUMACHER et al. 2011). Besonders zu erwähnen ist die erste kommerziell erhältliche Kompressionsschraube von Syntellix AG, Hannover, bestehend aus einer MgYREZr Legierung, welche gute Biokompatibilität und Osteokonduktivität zeigte (WAIZY et al. 2014).

Es stehen inzwischen mehrere unterschiedliche Magnesiumlegierungen (Kurzform: Hauptlegierungselement mit Massengehalt) wie MgCa0.8, LAE442, ZEK100 und LANd442 für die biomedizinische Forschung zur Verfügung (BONDARENKO et al. 2014). Geringe Legierungsveränderungen beeinflussen sowohl die mechanischen Eigenschaften als auch die Korrosionsgeschwindigkeit (REIFENRATH et al. 2010). Die Legierung LAE442 ist bekannt wegen ihrer niedrigen Korrosionsrate. Bereits eine geringe Zulegierung von Cerium (2 wt%) hat eine massiv erhöhte Korrosionsgeschwindigkeit der neuen Legierung zur Folge (REIFENRATH et al. 2010).

Generell müssen Legierungen auch an die Anforderungen des Implantationsgebietes angepasst werden, da die Korrosionsgeschwindigkeit davon beeinflusst wird (HUEHNER SCHULTE et al. 2012). Ein gut durchblutetes Implantatgebiet wird einem höheren Korrosionsdruck ausgesetzt als ein Bereich, der nur einem geringen Stoffaustausch unterliegt (XU et al. 2007). Dies ist insbesondere für Implantate in Grenzbereichen eine Herausforderung. Ein Platten-Schrauben-System zeigte für die Platte, welche zwar eine größere Masse besitzt aber an den gut durchbluteten Muskelbereich mit hohem Wassergehalt grenzte, eine höhere Korrosionsrate als die Schraube, welche hauptsächlich in dem weniger durchbluteten Knochenbereich mit niedrigerem Wassergehalt positioniert war (CHAYA et al. 2015a).

2.5 Polymere als Implantatbeschichtung

Legierungen werden zur Steuerung der Korrosionseigenschaften von Magnesium eingesetzt, wobei insbesondere Seltene Erden die Korrosionsgeschwindigkeit reduzieren. Aussagen zur Zytokompatibilität der enthaltenen Elemente wie z.B. Cerium oder Zirkonium sind jedoch ungewiss, weshalb weitere Methoden zur Reduktion der Korrosion geprüft wurden (WONG et al. 2010). Um die Korrosionsgeschwindigkeit herabzusetzen gibt es eine Reihe unterschiedlicher Beschichtungen und Oberflächenbehandlungen, wie Micro-Arc Oxidation (MAO), Plasma Anodisation, Fluorid-Beschichtung, Calcium-Phosphat-Beschichtung und Polymerbeschichtung (WONG et al. 2010; SEITZ et al. 2011; TAN et al. 2014). Vorteil der Polymerbeschichtung ist eine mögliche Funktionalisierung, sodass darüber eine ortsgebundene Abgabe von Faktoren erfolgen kann (CHEN et al. 2011; JI et al. 2014). Es werden verschiedene Beschichtungsmethoden eingesetzt, wie die Tauchbeschichtung, Sprühbeschichtung oder elektrochemische Ablagerung von PCL, PLA und Poly(3,4-ethylenedioxythiophen) (PEDOT) (CHEN et al. 2011; Guillaume et al. 2012; Sebaa et al. 2015).

2.6 In vitro- und in vivo-Zellbesiedlung von Implantaten

Durch den Einsatz von Zellen in in vitro-Zytokompatibilitätsstudien kann eine Vorauswahl entsprechender Materialien für den in vivo-Einsatz getroffen werden (TIAN et al. 2015). In vivo sollen vorkultivierte Zellen die Einheilung eines Implantates unterstützen. Insbesondere poröse Implantate genügen zum Einwachsen von Knochengewebe alleine nicht. Die geforderte Knochendurchbauung kann mit einer zusätzlichen Zellbesiedlung gesteigert werden (COWAN et al. 2004).

Osteoblasten werden oft in in vitro-Versuchen genutzt, um als ein wichtiger Bestandteil des Knochengewebes die in vivo-Bedingungen zu simulieren. Für in vivo-Versuche erfolgt die Gewinnung von Osteoblasten über die Entnahme körpereigener

mesenchymaler Stammzellen, welche in vitro zu Osteoblasten ausdifferenziert werden. Jedoch erzielen mesenchymale Stammzellen ohne vorherige Ausdifferenzierung offenbar ähnliche Ergebnisse (LEVI et al. 2010). Somit dienen Osteoblasten hauptsächlich zur Evaluation der Biokompatibilität in vitro, während insbesondere mesenchymale Stammzellen in vivo mit dem Ziel der beschleunigten Einheilung genutzt werden (WILLBOLD et al. 2013; BRIE et al. 2014).

Da umfangreiche Strukturen des Kopfbereiches, so auch das Knochengewebe, mesenchymalen Ursprungs sind, sind diese Zellen im Bereich des Tissue Engineerings besonders verbreitet (MAO et al. 2006). Diese mesenchymalen Stammzellen können u.a. aus Knochenmark oder aus Fett isoliert werden und ermöglichen ein verbessertes Einwachsen von Knochengewebe in das poröse Implantatkonstrukt (VAN DEN DOLDER et al. 2003; COWAN et al. 2004). Aus Fett isolierte Stammzellen haben den Vorteil der leichten Gewinnung einer großen Anzahl von Zellen und einer höheren Proliferationsrate im Gegensatz zu den Knochenmarkstammzellen. Die benötigte Zellzahl zur Implantatbesiedlung kann somit durch Fettstammzellen einfacher erzielt werden (COWAN et al. 2004).

Auch die Geometrie und die mechanischen Eigenschaften des Implantates haben einen Einfluss auf die in vitro besiedelten Zellen, sodass die Möglichkeit zur Anpassung dieser Parameter im Hinblick auf den Herstellungsprozess besonders wichtig ist. Mesenchymale Stammzellen zeigen z.B. eine von der Nanostrukturierung abhängige Proliferations- und Differenzierungsrate (SHEN et al. 2015). Ebenso haben die Porengröße und die Material-Steifigkeit einen Einfluss auf die Differenzierung von Stammzellen (KOROLEVA et al. 2015).

Stammzellen können neben der Fähigkeit zur Differenzierung in Osteoblasten die Vaskularisation fördern, indem sie proangiogene und antiapoptotische Faktoren, wie VEGF, Hepatocyte Growth Factor (HGF), und Transforming Growth Factor- β (TGF- β) ausschütten (REHMAN et al. 2004)

2.7 Vaskularisation und proangiogene Faktoren

Es besteht eine enge Verbindung zwischen Angiogenese und Knochenaufbau, wobei die Angiogenese durch ein Implantat gefördert werden kann (CARANO u. FILVAROFF 2003). Durch Veränderung der Implantatgeometrie kann wie zuvor beschrieben das Zellverhalten beeinflusst werden. Implantate, die für große knöcherne Defekte hergestellt werden, können durch eine Porenstruktur die Vaskularisation der Konstrukte erleichtern und somit eine starke Vernetzung von Knochen und Implantat ermöglichen (DRUECKE et al. 2004). Diese Vaskularisation kann jedoch nicht durch die Geometrie allein gewährleistet werden. Zusätzlich werden Faktoren eingesetzt, die eine beschleunigte Vaskularisation begünstigen (DRUECKE et al. 2004). Diese

Faktoren können effektiv über die zuvor beschriebene Polymerbeschichtung lokal an das Implantat gebunden und über die Zeit abgegeben werden (FU et al. 2014).

Wachstumsfaktoren, welche in der fetalen Knochenentwicklung oder späteren Knochenheilung exprimiert werden, könnten als mögliche Faktoren zur Funktionalisierung von Implantaten die Einheilung beschleunigen. Hierzu zählen Fibroblast Growth Factor (FGF), TGF, Bone Morphogenetic Protein (BMP), Insulin-like Growth Factor (IGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF) sowie VEGF (CARANO u. FILVAROFF 2003). HMGB1 ist bekannt für seine Freisetzung durch Osteoblasten (YANG et al. 2008). Zudem fördert es die Angiogenese, indem HMGB1 u.a. zu einer Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in endotheliale Progenitorzellen führt (NAKAMURA et al. 2015).

BMP-2 ist einer der häufigsten in der Literatur untersuchten Faktoren (BESSA et al. 2008). In einem Kaninchen-Modell mit Calvariadefekt zeigte BMP-2 inkorporiert in eine Silica-Chitosan-Beschichtung auf porösem Hydroxylapatit eine vermehrte Knochenneubildung (JUN et al. 2013). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass BMP-2 zu einer erhöhten VEGF-Ausschüttung bei mesenchymalen Stammzellen führt und somit einen indirekten Einfluss auf die Angiogenese hat (DECKERS et al. 2002).

VEGF ist besonders in der frühen Phase des Knochenaufbaus von großer Bedeutung und fördert nicht nur die Neovaskularisation, sondern auch die Migration und Differenzierung von Osteoblasten. Somit führt VEGF Angiogenese mit Knochenbildung und Remodeling zusammen (STREET et al. 2002). Mit VEGF funktionalisierte Titanimplantate wiesen im Rattenmodell einen verstärkten Knochen-Implantat-Kontakt auf (SCHLIEPHAKE et al. 2015).

Das Grundgerüst eines zukunftsfähigen Knochenimplantates liegt derzeit in einem biodegradierbaren Implantat mit knochenähnlichen mechanischen Eigenschaften und offenen Porenstrukturen, das über ein Rapid Prototyping Verfahren patientenindividuell an den Knochendefekt angepasst wird. In Kombination mit einer Zellbesiedlung und der Funktionalisierung mit Wachstumsfaktoren kann die Integration und der Knochenaufbau beschleunigt werden und im besten Fall eine belastbare Knochenstruktur vorliegen, aus der das künstliche Trägermaterial resorbiert ist.

3 Studie 1

Das folgende Manuskript wurde von dem Journal „Biomedical engineering / Biomedizinische Technik“ am 07.09.2013 veröffentlicht.

Characterisation of Cell Growth on Titanium Scaffolds Made by Selective Laser Melting for Tissue Engineering

Nummer 67. doi: 10.1515/bmt-2013-4047

PMID: 24042642

J. Matena¹, M. Gieseke², A. Kampmann³, S. Petersen⁴, H. Murua Escobar¹, K. Sternberg⁴, H. Haferkamp², N.-C. Gellrich³, I. Nolte¹

¹ Klinik für Kleintiere, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland

² Laser Zentrum Hannover e.V. , Deutschland

³ Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover, Deutschland

⁴ Institut für Biomedizinische Technik, Universität Rostock, Deutschland

julia.matena@tiho-hannover.de

Abstract

Individual optimisation of patient implants with the ability to model surfaces in μm -range is of considerable interest. Selective Laser Melting (SLM) allows the construction of nearly any desired structure enabling a custom adaptation according to the patients` requirements. We evaluated a titanium construct made by Selective Laser Melting for optimised osseointegration in vitro. Using fluorescent osteoblasts adherence was shown on the titanium superficial scaffold structure. Furthermore, we analysed the proliferative behaviour of primary osteoblasts and an endothelial cell line by stimulation with angiogenic factors VEGF and HMGB1.

Keywords: Titanium, Implant, Osteoblast, VEGF, HMGB1

4 Studie 2

Das folgende Manuskript wurde von dem Journal „International Journal of Molecular Sciences“ am 02.04.2015 veröffentlicht.

SLM reduced Porous Titanium Implant Improvements for Enhanced Vascularization and Osteoblast Seeding

16(4):7478-92. doi: 10.3390/ijms16047478

PMID: 25849656

Julia Matena ¹, Svea Petersen ², Matthias Gieseke ³, Andreas Kampmann ⁴, Michael Teske ², Martin Beyerbach ⁶, Hugo Murua Escobar ^{1,5}, Heinz Haferkamp ⁷, Nils-Claudius Gellrich ⁴ and Ingo Nolte ^{1*}

¹ Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Buenteweg 9, D-30559 Hannover, Germany; E-Mails: julia.matena@tiho-hannover.de; ingo.nolte@tiho-hannover.de;

² Institute for Biomedical Engineering, Rostock University Medical Center, F.-Barnewitz-Str. 4, D-18119 Rostock, Germany; E-Mails: svea.petersen@uni-rostock.de; michael.teske@uni-rostock.de;

³ Materials and Processes Department, Laser Zentrum Hannover e.V., Hollerithallee 8, D-30419 Hannover, Germany; E-Mails: m.gieseke@lzh.de;

⁴ Clinic for Cranio-Maxillo-Facial Surgery, Hannover Medical School, Carl-Neubergstraße 1, D-30625 Hannover, Germany; E-Mails: kampmann.andreas@mh-hannover.de; gellrich.nils-claudius@mh-hannover.de;

⁵ Division of Medicine Clinic III, Hematology, Oncology and Palliative Medicine, University of Rostock, Ernst-Heydemann-Str. 6, D-18057 Rostock, Germany; E-Mail: hugo.murua.escobar@med.uni-rostock.de;

⁶ Institute for Biometry, Epidemiology and Information Processing, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Buenteweg 2, D-30559 Hannover, Germany; E-Mail: martin.beyerbach@tiho-hannover.de;

⁷ Institut fuer Werkstoffkunde, Leibniz Universitaet Hannover, D-30823 Hannover, Germany; E-Mail: haferkamp@iw.uni-hannover.de;

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: ingo.nolte@tiho-hannover.de; Tel.: +49 511 953 6400; Fax: +49 511 953 6203.

Abstract

To improve well-known titanium implants, pores can be used for increasing bone formation and close bone-implant interface. Selective Laser Melting (SLM) enables the production of any geometry and was used for implant production with 250- μm pore size. The used pore size supports vessel ingrowth, as bone formation is strongly dependent on fast vascularization. Additionally, proangiogenic factors promote implant vascularization. To functionalize the titanium with proangiogenic factors, polycaprolactone (PCL) coating can be used. The following proangiogenic factors were examined: vascular endothelial growth factor (VEGF), high mobility group box 1 (HMGB1) and chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12). As different surfaces lead to different cell reactions, titanium and PCL coating were compared. The growing into the porous titanium structure of primary osteoblasts was examined by cross sections. Primary osteoblasts seeded on the different surfaces were compared using Live Cell Imaging (LCI). Cross sections showed cells had proliferated, but not migrated after seven days. Although the cell count was lower on titanium PCL implants in LCI, the cell count and cell spreading area development showed promising results for titanium PCL implants. HMGB1 showed the highest migration capacity for stimulating the endothelial cell line. Future perspective would be the incorporation of HMGB1 into PCL polymer for the realization of a slow factor release

Keywords: titanium implant, selective laser melting, polycaprolactone, VEGF, HMGB1, CXCL12, cross section, live cell imaging, osteoblast, cell migration

5 Studie 3

Das folgende Manuskript ist zur Einreichung für das Journal „International Journal of Molecular Sciences“ vorbereitet.

PCL and P(3HB) Coating for Functionalization of Selective Laser Melted Titanium and Magnesium Scaffolds

Julia Matena¹, **Svea Petersen**², **Matthias Gieseke**³, **Pooyan Alouis**⁴, **Michael Teske**², **Günter Reuter**⁴, **Martin Beyerbach**⁵, **Andreas Kampmann**⁶, **Hugo Murua Escobar**^{1,7}, **Nils-Claudius Gellrich**⁶, **Heinz Haferkamp**⁸, and **Ingo Nolte**^{1*}

¹ Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Buenteweg 9, D-30559 Hannover, Germany; E-Mails: julia.matena@tiho-hannover.de; ingo.nolte@tiho-hannover.de;

² Institute for Biomedical Engineering, Rostock University Medical Center, F.-Barnewitz-Str. 4, D-18119 Rostock, Germany; E-Mails: svea.petersen@uni-rostock.de; michael.teske@uni-rostock.de;

³ Laser Zentrum Hannover e.V., Hollerithallee 8, D-30419 Hannover, Germany; E-Mail: m.gieseke@lzh.de;

⁴ Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Hannover Medical School, Carl-Neubergstraße 1, D-30625 Hannover, Germany; Cluster of Excellence “Hearing4All”, Hannover, Germany; E-Mail: aliuos.pooyan@mh-hannover.de; guenter.reuter@mh-hannover.de;

⁵ Institute for Biometry, Epidemiology and Information Processing, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Buenteweg 2, D-30559 Hannover, Germany; E-Mail: martin.beyerbach@tiho-hannover.de

⁶ Clinic for Cranio-Maxillo-Facial Surgery, Hannover Medical School, Carl-Neubergstraße 1, D-30625 Hannover, Germany; E-Mails: kampmann.andreas@mh-hannover.de; gellrich.nils-claudius@mh-hannover.de;

⁷ Division of Medicine Clinic III, Hematology, Oncology and Palliative Medicine, University of Rostock, Ernst-Heydemann-Str. 6, D-18057 Rostock, Germany; E-Mail: hugo.murua.escobar@med.uni-rostock;

⁸ Institut fuer Werkstoffkunde, Leibniz Universitaet Hannover, An der Universitaet 2, D-30823 Hannover, Germany; E-Mail: haferkamp@iw.uni-hannover.de;

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: ingo.nolte@tiho-hannover.de; Tel.: +49 511 953 6400; Fax: +49 511 953 6203.

Abstract: Degradable implant material for bone remodeling that corresponds to the physiological stability of bones has still not been developed. Promising degradable materials with good mechanical properties are magnesium and magnesium alloys. However, excessive gas production due to corrosion can lower the biocompatibility. In the present study we used either the polymer coating polycaprolactone or poly-3-hydroxybutyrate (PCL or P(3HB)), intended to lower the corrosion rate of magnesium. Additionally, improvement of vascularization can increase bone remodeling. Porous structures are known to support vessel ingrowth and thus increase osseointegration. With the Selective Laser Melting (SLM) process constructs with such porous structures can easily be created. Here, the geometry was created out of TiAl6V4 titanium alloy and, after polymer coating, used for the first studies. Recently, highly reactive magnesium has also been processed by SLM. We performed preliminary studies with a flat magnesium layer coated with polymers. For testing the biocompatibility we performed Live Cell Imaging (LCI) using osteoblasts and multipotent mesenchymal stromal cells. Our results showed a reduced corrosion rate and good biocompatibility of the SLM produced magnesium using PCL coating. For the first time the method presented the possibility to create porous magnesium structures using SLM.

Keywords: titanium implant, magnesium implant, polycaprolactone, poly-3-hydroxybutyrate, live cell imaging, osteoblast, multipotent mesenchymal stromal cells

1. Introduction

Autografts are commonly used for reconstruction of critical defects in maxillo–facial orthopedics, e.g. after accidents or tumor resections [1]. The bony material can be taken from intact bone, generally out of the hip. Therefore, the patient has to undergo surgery. Furthermore, the material itself is rare and the donor site often remains painful [2,3]. To avoid additional surgery, a material with appropriate conditions comparable to bone is needed. Many different resorbable materials for bone tissue engineering have been examined for this purpose, such as PLGA–based or (PHBHHx)–based scaffolds. However, there are no commercial implants that can meet physiological forces since the early beginning of implantation and desired degradation at the same time [4,5]. Materials that potentially can fulfill these demands are magnesium and magnesium alloys since they are promising resorbable robust metals [6,7]. They are biocompatible and the elastic modulus is close to that of bone. In the last few years many studies have shown good biocompatibility of magnesium–based implants [7]. However, the gas that this material produces is a major disadvantage, lowering the bone–implant contact. Therefore, different coatings or magnesium alloys are used to lower the corrosion rate [8]. After careful consideration, we decided to use polymer coatings. PCL, this synthetically produced polymer showed good results to lower the corrosion rate of magnesium [9,10]. Another polymer we examined was P(3HB). P(3HB) is biologically produced and hence we expected a better biocompatibility in comparison with PCL [11,12]. Using different materials the best properties can be combined. Both magnesium and polymer are resorbable. Magnesium provides stability, while the polymer protects the implant from initial corrosion.

Scaffold geometry can be used to enhance vascularization and consequently achieve a good bony ingrowth. Recent studies have shown that porous scaffolds with 250 μm interconnected pores support angiogenesis [13,14]. Moreover, the elastic modulus can be adapted to bone by variation in strut size and thus can help to overcome the long–term side effect resulting in stress shielding [15]. Recently, magnesium scaffolds have also been generated using SLM as well [16], but resolution of 250 μm has not been achieved yet.

Manufacturing titanium scaffolds using SLM is well established [17,18]. SLM produced titanium scaffolds with 230 μm struts and pores showed good mechanical results in force loading femur defects and also showed osteoconductivity [19]. SLM fabricated porous titanium implants are established and known to be stable [20].

Preliminary tests were carried out using the established titanium implant with 250 μm interconnected pores coated with PCL or P(3HB) for cell culture to test the behavior of primary cells on the porous structure. Murine green fluorescent protein (GFP) osteoblasts and murine GFP multipotent mesenchymal stromal cells (MSC) were used for vitalizing the hybrid construct. Comparing the cell behavior at the different polymers we performed Live Cell Imaging (LCI), proliferation assays and vitality assays.

Cell adhesion to the implant surface is a basic requirement to achieve a tight bone–implant contact. To test the adhesion strength of osteoblasts to the different polymers, we performed single cell force spectroscopy (SCFS) as recently reported [21].

Since it is possible to process magnesium by SLM as recently described [16], we created an open porous magnesium implant with 600 μm pore size. As 250 μm has not yet been fulfilled, a flat SLM-made magnesium structure on a titanium scaffold coated with PCL, later referred to as magnesium hybrid construct, was manufactured and used for first studies. P(3HB) did not completely cover the surface, and was therefore not used. For magnesium corrosion we examined gravimetry and pH values as well as performing scanning electron microscopy (ESEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) measurements. LCI studies were performed as well. This being an effective way to follow cell behavior. To the best of our knowledge, to date, no studies have shown living cells settled on the magnesium implant's surface to track the cells live over a long time period. However, the establishment of novel *in vitro* methodologies for the analyses of magnesium constructs remains key, as recent studies revealed major differences between *in vitro* and *in vivo* results limiting the predictive power of conventional *in vitro* systems for *in vivo* scenarios in general [22-24].

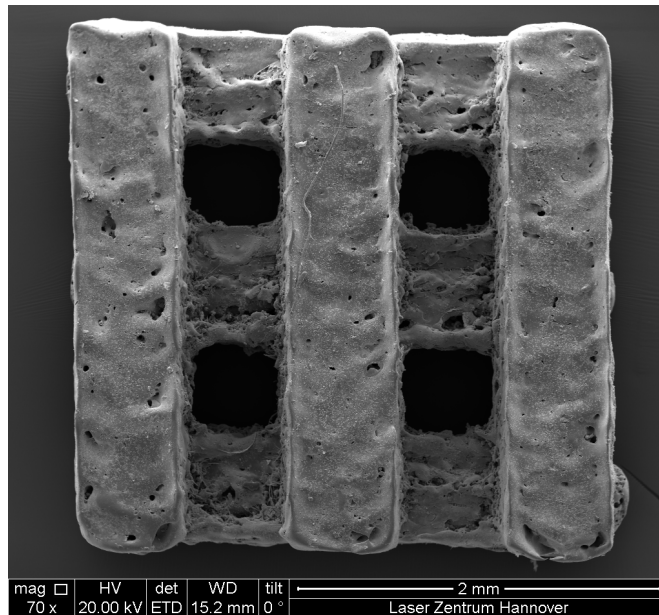
Open porous magnesium structures generated by SLM and coated with PCL could be a way to overcome the deficiency in potential biodegradable and stable material for bone implants. The herein presented work should be a first step to overcome this deficiency.

2. Results

2.1. Manufacturing

A titanium implant with 250 μm pore and strut size and a flat magnesium layer on titanium was produced by SLM and provided for *in vitro* experiments. A magnesium implant with 600 μm pore size was manufactured of pure magnesium by SLM (Figure 1).

Figure 1. SEM micrograph of magnesium implant manufactured by SLM.



2.2. Characterization of Polymeric Coatings on Porous Titanium Scaffolds

Polymeric coatings on porous titanium scaffolds were visualized via ESEM and EDX-measurements. Whereas pores remained wide open after PCL-coating, the P(3HB)-coating, established under the same experimental conditions, covered pores (Figure 2B, C). Moreover, the PCL-coating resulted in a smooth coverage of the surface with SLM-induced microparticles (Figure 2E). In contrast, the P(3HB)-coating seemed to be rather perforated and inhomogeneous (Figure 2F). EDX-measurements revealed a considerable increase in the atomic percentage of carbon for both coatings in comparison to the non-coated titanium scaffolds (Table 1).

Figure 2. Representative ESEM micrographs of non-coated (A, D), PCL-coated (B, E) and P(3HB)-coated (C, F) porous titanium scaffolds as an overview and in detail.

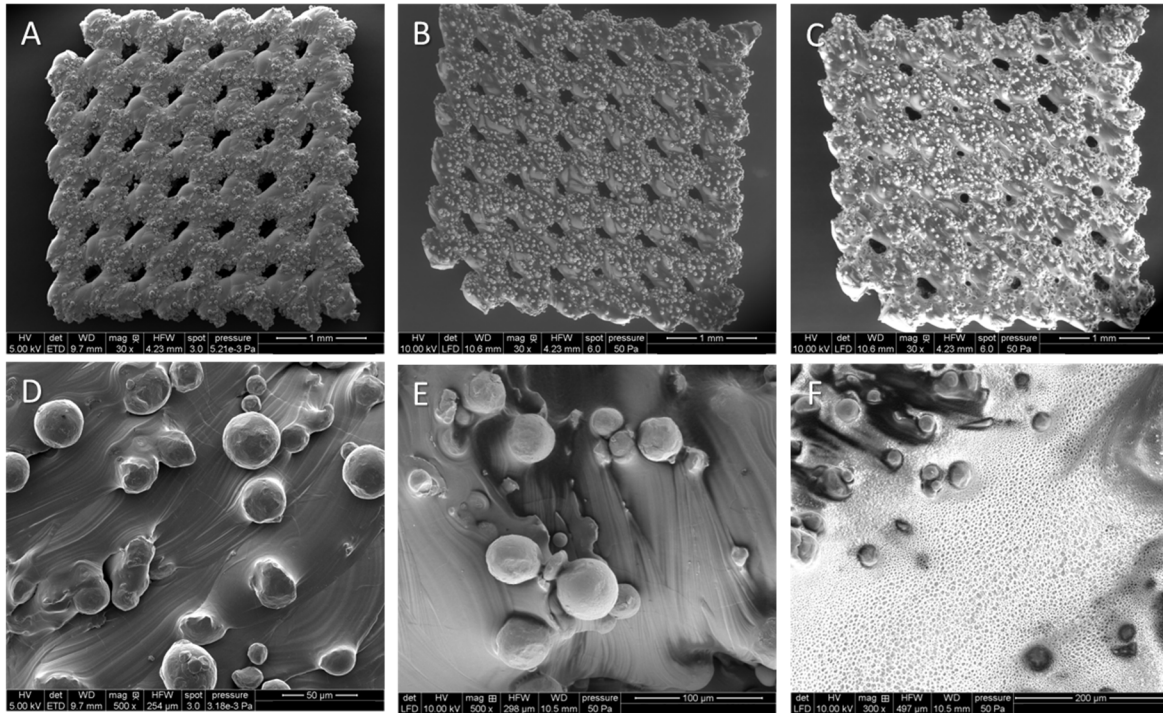


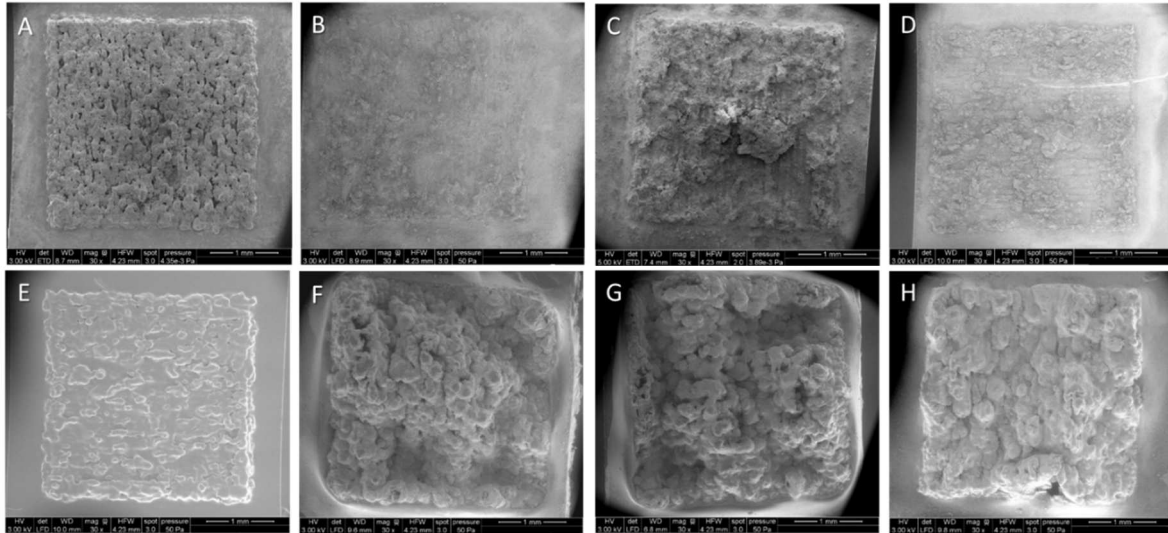
Table 1. EDX data on surface composition (atomic percent (At-%)) for the relevant elements titanium (Ti) and carbon (C) of the coated porous titanium scaffolds.

Scaffold modification	At-% Ti	At-% C
Non-coated	93.74	6.26
PCL-coated	3.90	96.10
P(3HB)-coated	21.34	78.66

2.3. In Vitro Corrosion Study

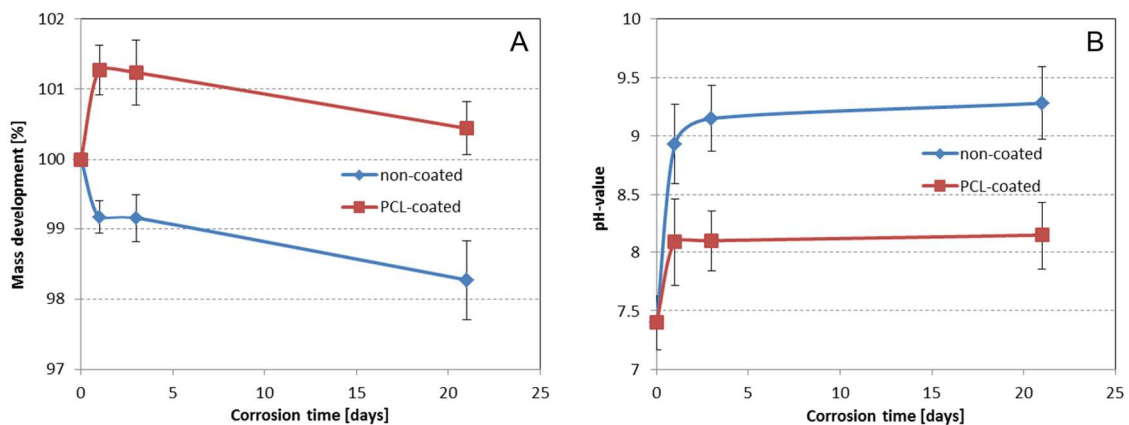
Microscopic studies were performed to evaluate the *in vitro* corrosion-induced changes in surface morphology of the non-coated and PCL-coated magnesium structures. It was observed that the non-coated magnesium structures nearly disappeared in the short corrosion time of 3 weeks, while the PCL-coated structures seemed even to expand (Figure 3).

Figure 3. Representative ESEM micrographs of non-coated (A–D) and PCL-coated (E–H) magnesium structures after different corrosion time intervals (A, E: 0 days; B, F: 1 day; C, G: 3 days; D, H: 21 days).



This observation could be confirmed by means of mass development analysis. The non-coated structures lost up to 2 % of the initial total mass (SLM processed magnesium structure and titanium base structure), whereas the PCL-coated samples seemed to gain in mass (Figure 4A).

Figure 4. Corrosion-induced mass loss of non-coated and PCL-coated magnesium structures (A) and pH-value of surrounding medium (B) in Sørensen buffer (0.1 M, pH 7.4) at 37 °C. Data shown as means ± SD.



To evaluate this result and to demonstrate the presence or absence of the PCL-coating during *in vitro* corrosion, the chemical composition of the initially PCL-coated magnesium structures was evaluated by EDX measurements. As shown in Table 2, the atomic percent of

magnesium (Mg) and oxygen (O) increased, whereas the atomic percent of C decreased within the first 24 h. In the following corrosion time, no further modification of the chemical composition seemed to occur. Furthermore, the evolution of the pH values during the corrosion study was investigated. Thus, the polymer specimens were immersed in buffer without intermediate medium change. For both, non-coated and coated samples, a constant increase in the pH-value was observed, which was, however, more prominent for non-coated (highest pH: 9.3; Figure 3B) than for coated specimens (highest pH: 8.1; Figure 3B).

Table 2. EDX data on surface composition (atomic percent for the relevant elements Ti, O and C) of the PCL-coated magnesium structures after different corrosion intervals.

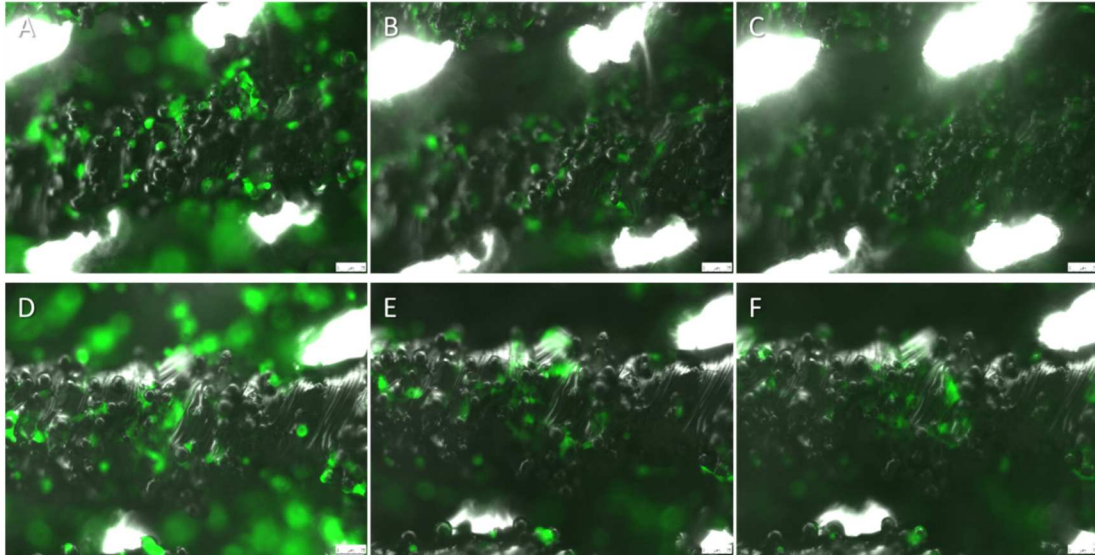
Corrosion time [days]	At-% Mg	At-% O	At-% C
0	0.06	34.08	65.86
1	6.19	54.96	38.85
3	6.33	52.75	40.92
21	4.82	54.99	40.19

2.4. LCI of Titanium Implant

Comparison of PCL and P(3HB) Coating Seeded with GFP-Osteoblasts or GFP-MSK

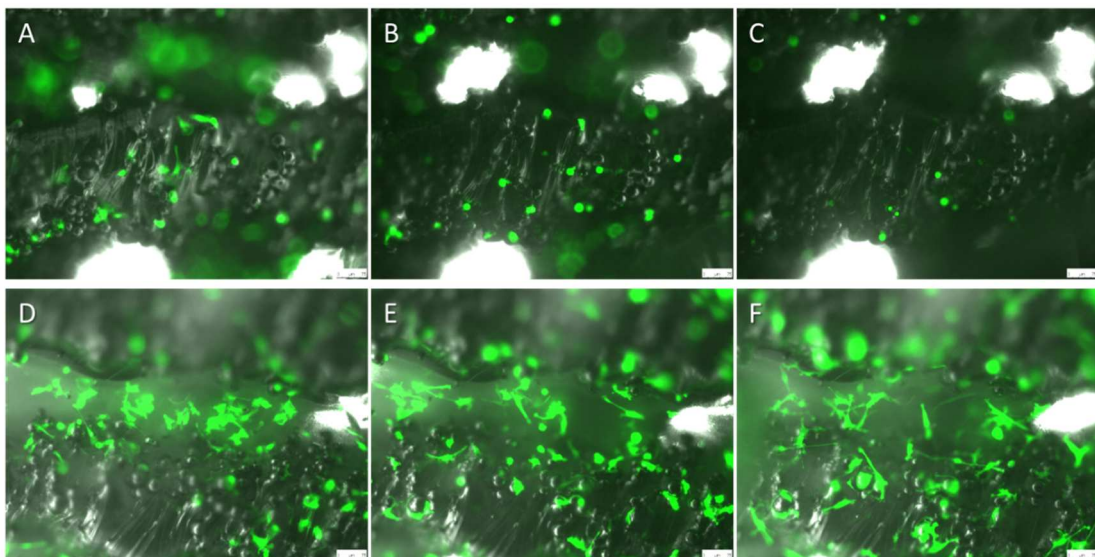
LCI of osteoblasts settled on PCL and P(3HB) coated titanium scaffolds showed good results for both polymers (Figure 5). Even after 7 days cells showed a flattened, vital morphology.

Figure 5. LCI GFP–osteoblasts settled on PCL coated titanium implant four hours after seeding (**A**), after three days (**B**) and after seven days (**C**), respectively. GFP–osteoblasts settled on P(3HB) coated titanium scaffolds for four hours (**D**), three days (**E**) and seven days (**F**), respectively.



Using LCI, GFP–MSC settled on P(3HB) showed a significantly more flattened morphology after 6 days and a greater number of cells after 7 days in comparison with PCL coating (Figure 6). Statistical analysis for LCI was performed using the two-sample t–test ($p < 0.05$).

Figure 6. In LCI GFP–MSC settled on the PCL coated titanium scaffold four hours after seeding (**A**), after three days (**B**) and after seven days (**C**), respectively. GFP–MSC settled on P(3HB) coated titanium scaffolds for four hours (**D**), three days (**E**) and seven days (**F**), respectively.



2.5. Proliferation Assay and Vitality Assay

Comparison of PCL and P(3HB) Seeded with Osteoblast or GFP-MSC

These results of LCI were verified by vitality assay and cell counting (Figure 7, 8). Vitality assay of osteoblasts showed a significant lower vitality for PCL in comparison with the well plate bottom, whereas there was no difference between P(3HB) and the well plate bottom (Figure 7A). The proliferation index showed no difference between all three groups (Figure 7B).

Figure 7. (A) Percentage of vitality for GFP–osteoblasts settled on well bottom, PCL and P(3HB). Ryan–Einot–Gabriel–Welsh Multiple Range Test for vitality showed a significant difference between well bottom (WB) and PCL ($p < 0.05$). (B) Proliferation index of GFP–osteoblasts for different materials (well bottom, PCL and P(3HB)). There was no significant difference between the materials (Global F-Test from the Analysis of Variance and Ryan–Einot–Gabriel–Welsh Multiple Range Test, $p < 0.05$).

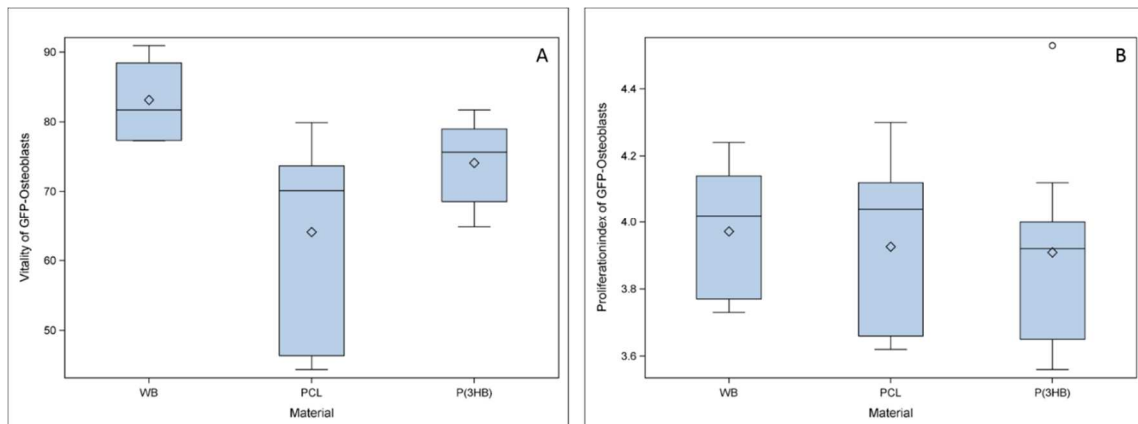
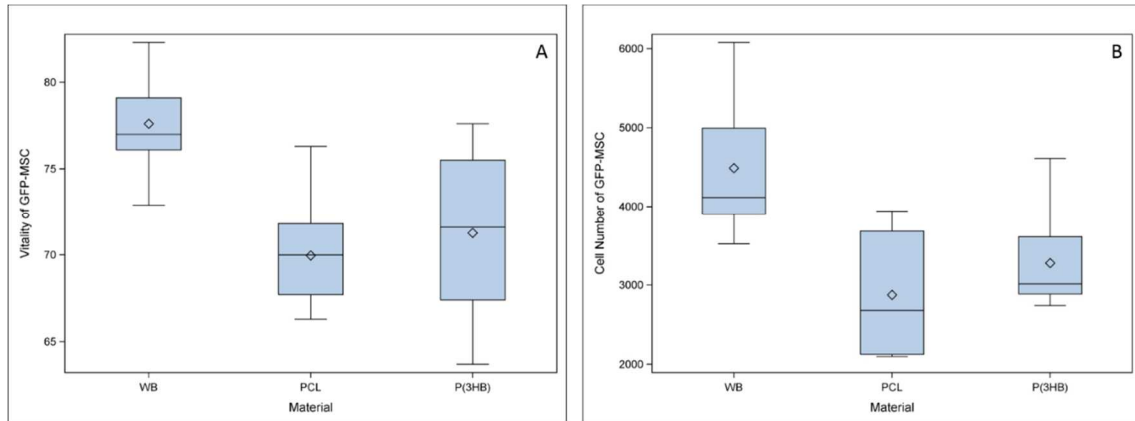


Figure 8. (A) Vitality [%] of GFP–MSC settled on WB, PCL and P(3HB) for two days. Global F-Test from the Analysis of Variance and Ryan–Einot–Gabriel–Welsh Multiple Range Test for vitality showed a significant difference between the WB, PCL and P(3HB). (B) Cell counting of GFP–MSC settled on the well bottom, PCL and P(3HB). Global F-Test from the Analysis of Variance and Ryan–Einot–Gabriel–Welsh Multiple Range Test for vitality showed a significant difference between the well bottom and PCL respectively P(3HB).

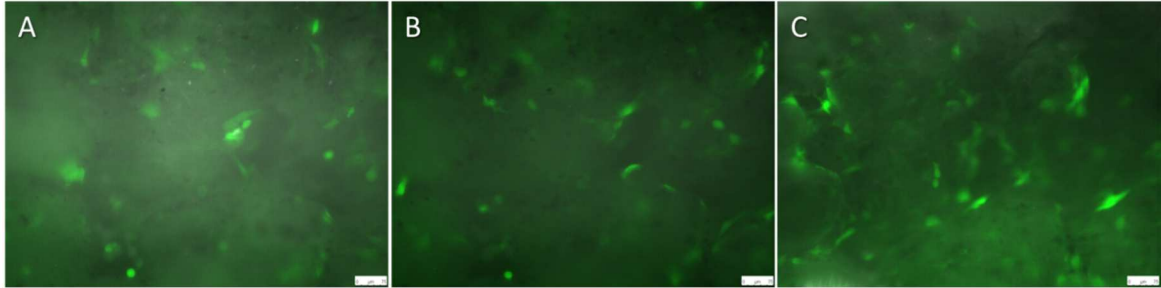


Vitality and proliferation assays were performed for GFP–MSC settling on the well plate and both polymers (Figure 8A,B). For both vitality and cell count there was no difference between the polymers, but between the polymers and the well plate bottom. Here, higher vitality and cell count was shown for the well plate bottom that was used as positive control. The assays were performed for two days. In LCI no difference could be observed after two days. Statistical analysis for proliferation and vitality assay was performed using the global F-test from the Analysis of Variance and the Ryan–Einot–Gabriel–Welsh Multiple Range Test ($p < 0.05$).

2.6. LCI of Magnesium Hybrid Construct Compared with the Titanium Implant Coated with PCL Seeded with GFP–Osteoblast

Comparing cell counts after the initial seeding of osteoblasts settled on the PCL coated titanium (Figure 5 A, B, C) and on the hybrid construct (Figure 9 A, B, C) no difference could be observed.

Figure 9. Osteoblasts seeded on the magnesium hybrid construct at the first day (A), day 3 (B) and day 7 (C).

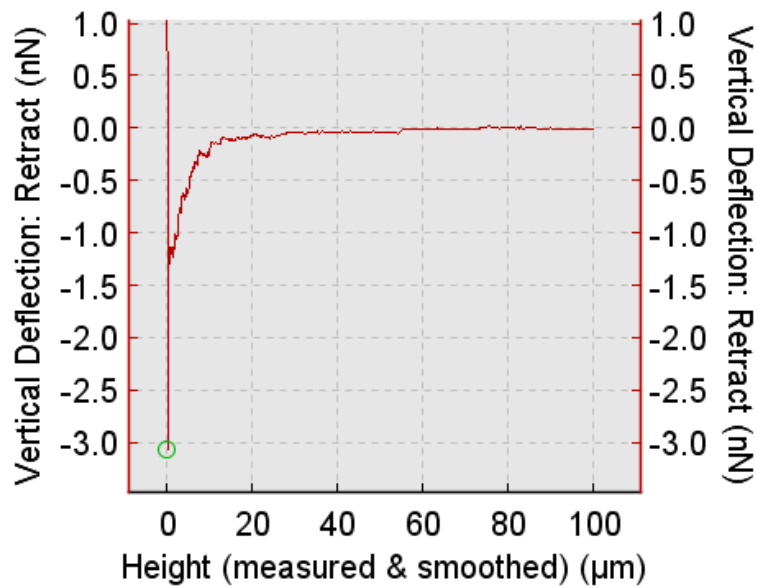


After two days settling time the cell count was significantly lower on the hybrid construct. We could also see a significant difference between the two scaffolds regarding the cell spreading area at the time point directly after seeding as LCI for the PCL coated titanium implant was started after 4h cell settling time and for the hybrid construct after 1 hour, respectively. On Day 1–7 no difference occurred in the cell spreading area. The statistical analysis was performed using the unpaired t–test ($p < 0.05$).

2.7. Single Cell Force Spectroscopy (SCFS)

As proliferation assays did not show significant results, SCFS was performed for quantitative evaluation of single cell adhesion onto different polymer surfaces. Fifteen single osteoblasts were used to investigate the adhesion of osteoblasts to each surfaces variety. Each cell was allowed to adhere to polymer as well as to Petridish surfaces for 5, 30 and 180 seconds. By averaging the maximum detachment forces (the peak of the curve in fig. 10) of those cells the adhesion force of osteoblasts onto the surfaces was determined. The SCFS investigations revealed no significant (signed–rank–test) changes in osteoblasts’ adhesion at all different interaction times onto the polymer surfaces compared with each other and with Petridish surface.

Figure 10. Force-Displacement (FD) curve of a single osteoblast, adhered for 180 seconds onto PCL surface. The curve shows maximum detachment force (the peak) of the cell and single cell-PCL surface bindings that were separated by moving away the cell from PCL surface (little force steps). SCFS results revealed no significant difference between the adhesion of osteoblasts onto well plate-, PCL- and P(3HB)-surfaces.. The signed-rank-test for paired observations with $p < 0.05$ was used.



3. Discussion

3.1. Manufacturing

The SLM process is achieved by wetting solidified material with liquid metal melted by laser radiation. Oxide layers impedes the wetting process and therefore have to be removed [25]. The titanium alloy TiAl6V4 shows a large solubility for oxygen [26], and it is assumed that oxides can be easily dissolved [27]. Thus, medical parts with an adequate surface quality can be manufactured [28]. Magnesium, in contrast, shows no solubility for oxygen [29] and also a very ductile oxide layer which is difficult to break [30]. Using comparably high laser power the oxide layer can be broken up and removed to facilitate the process. This results in large evaporations of magnesium enforced by its low boiling point of magnesium. Also regions of adhering sintered particles were found on the manufactured parts, decreasing the surface

quality. Nevertheless, medical parts with an adequate surface quality can be manufactured by adjusting the scanning strategy and performing a chemical post treatment.

3.2. Characterization of Polymeric Coatings on Porous Titanium Scaffolds

Polymeric coating of porous titanium scaffolds was investigated after scaffold construction with the purpose to evaluate coating parameters for magnesium scaffolds. We decided to use synthetic biodegradable PCL with already reported positive effect on the corrosion rate of magnesium and P(3HB) generated via fermentation and with a possibly better biocompatibility. Visualization of the achieved coatings via scanning electron microscopy revealed differences in surface structure. Whereas PCL-coating produced a smooth scaffold surface without pore occlusion, the P(3HB)-coating, established under the same experimental conditions, showed a rather inhomogeneous surface with pore occlusion (Figure 1). We dedicate this observation to the different glass transition temperatures of the polymers ($T_g(\text{PCL}) = -60\text{ }^\circ\text{C}$; $T_g(\text{P(3HB)}) = 1\text{ }^\circ\text{C}$). At $23 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$, as applied during coating experiments, this results in considerable changes in the mechanical properties of the polymers. For instance, PCL has an elongation at break of 600–1000%, while P(3HB) has an elongation at break of only 5 %. Hence, PCL is more fluid and able to penetrate the scaffold pores during the coating experiment. Moreover, the used polymers have different molecular weights (PCL = 80,000 g/mol; P(3HB) = 760,000 g/mol), resulting in a different viscosity and fluidity of the applied coating solutions ($\eta(\text{PCL}) = 1.53\text{ Nsm}^{-2}$; $\eta(\text{P(3HB)}) = 2.26\text{ Nsm}^{-2}$ as estimated by Ubbelohde viscosimetry), which might support the observed better surface coverage with PCL. Thus, reducing the concentration of the P(3HB) solution can potentially improve the coating surface appearance up to a certain degree. However, coating thickness will decrease even further, which is already expected to be lower via chosen coating parameters as EDX measurements reveal a higher abundance of C atoms from polymer after PCL-coating than after P(3HB)-coating.

3.3. In Vitro Corrosion Study

Moreover, since the general brittleness of the P(3HB)-coating will be maintained, we performed a simple corrosion study with PCL-coated flat magnesium structures fixed on a titanium support. In comparison to non-coated samples, PCL-coated samples gained in mass and increased atomic percentage of Mg and O, whereas the atomic percentage of C decreased within the first 24 h. This suggests the formation of magnesium hydroxide by water interpenetration within the polymer coating; protecting complete wash off of the flat magnesium structure from the titanium support, which is the case for non-coated samples. Furthermore, the magnesium hydroxide layer seems to function as passivation of the magnesium structure since no further alteration of the surface chemical composition was

observed during the following corrosion time. The more prominent increase of the pH-values for non-coated samples supports this hypothesis. Generated hydroxy-ions during magnesium corrosion are thus kept on the surface of coated samples, while they are released into the surrounding media for non-coated samples resulting in greater pH. In conclusion, the biodegradable PCL-coating allows stabilization of the magnesium structure and is hence a promising candidate for alteration of the corrosion rate of magnesium-based implants.

3.4. LCI of Titanium Implant

In LCI GFP-osteoblasts settled on PCL and P(3HB) coated titanium scaffolds showed good results for both polymers. No significant difference was found between PCL and P(3HB). Even after 7 days cells showed a flattened and vital morphology (Figure 4).

Using GFP-MSK on day 6 cells showed a round morphology on PCL and on day 7 fewer cells were counted. Thus, by using LCI we could follow the changes in cell behavior.

LCI gives us the opportunity to track viable cells on the nontransparent surface by following morphology, proliferation and migration behavior. Cells were imaged over seven days. That is a great opportunity to be able to test cell behavior.

3.5. Proliferation Assay and Vitality Assay

Although the polymers used are hydrophobic and should theoretically lead to low cell adhesion and thus proliferation, this could not be confirmed. Osteoblast proliferation includes interactions with extracellular matrix proteins. There are various integrins binding to fibronectin, osteopontin, type 1 collagen for example [31]. Adhesion to an implant is important for cell survival. However, this behavior could be due to the fact that there is mainly an indirect binding to the implant due to ECM molecules binding to the surfaces [32].

As well we showed slightly better vitality of GFP-osteoblasts and GFP-MSK for the P(3HB) coating in comparison to PCL. Therefore, our hypothesis has only been partly confirmed, namely the biologically produced P(3HB) should be more biocompatible.

3.6. LCI of Magnesium Hybrid Construct Compared with the Titanium Implant Coated with PCL Seeded with GFP-Osteoblast

Using LCI it was demonstrated that osteoblasts initially showed similar seeding densities for both implants. After two days, cell numbers decreased on the hybrid construct. As gas production is part of the magnesium corrosion process, it is suggested that cells could be removed from the surface without effecting viability of the remaining cells. That was confirmed

by the cell spreading area which showed a flattened cell shape from day 1–7. Nevertheless, vital cell morphology was found on both implants, the titanium implant and magnesium hybrid construct.

Often, magnesium is represented as supernatant to cells attached to the well plate bottom in indirect cell culture experiments [33,34]. The influence of adherence strength to study cells is missing when using indirect methods. Other studies showed growing cells in LCI settled at well plate bottoms when exposed to degraded products of magnesium [35]. Especially for magnesium it is highly important to monitor cells directly on the implant's surface. Due to diffusion, the chemical and physical conditions directly at the magnesium surface in comparison with supernatant of dissolved magnesium solution are different. The pH on the surface could be much greater than the average pH of the solution [36].

Direct assays are performed by cell fixation and thus show one time point only [37-39]. The established LCI assay has the advantage of direct assays and moreover one can follow living cells over time (Video S1). Thus, we were able to confirm that cells settled on the magnesium hybrid construct in comparison to the titanium implant coated with PCL.

Other studies showed good results for bone growing using PCL [40]. PCL coating showed promising results for corrosion resistance of magnesium and thus can be used for bone tissue engineering. As magnesium is a promising material in the field of bone reconstruction, this hybrid construct has great potential [7].

Especially open porous magnesium has been considered as a potential means of treating bony defects [41,42]. So far, magnesium structures having interconnected pores with 250 μm have not been made by any additive manufacturing technology. Further investigations on SLM of magnesium and magnesium alloys showed that the use of magnesium alloys can significantly improve the SLM process. The aim of further studies is to build a stable degrading implant that can be adjusted by rapid manufacturing to any geometry necessary.

PCL coating of magnesium showed good potential for corrosion and cell cultures. PCL offers us the opportunity to incorporate growth factors as recently shown [43]. These components are the backbone of the diamond concept suggested by Giamond et al. [44].

3.7. Single Cell Force Spectroscopy (SCFS)

To confirm our results we performed SCFS. Here, no significant difference was found again. Since polymer surfaces were not smooth, results showed high variance of cell adherence strength. Settling the cell on an uneven surface resulted in a changed x-axis direction and also in magnitude. This method would be more sensible using flat samples. MSC could not be examined by SCFS as the cell size can be very different and directly effect the adhesion strength.

4. Methods

4.1. SLM of Titanium and Magnesium Implants

The titanium implants were manufactured by SLM by SLM Solutions GmbH, Germany from a TiAl6V4 titanium alloy.

The magnesium implants were manufactured by SLM from pure magnesium powder Atoultra 325 provided by SFM SA, Switzerland. An SLM125^{HL} machine system equipped with an overpressure capable process chamber provided by SLM Solutions GmbH, Germany was used to process this material. Using a laser power of 100 W, a scan speed of 3000 mm/s and an adapted hatch strategy, scaffolds with a homogenous surface quality were manufactured. Nevertheless, porous magnesium implants had to be post treated by a chemical deburring process in order to remove adhering particles and to gain smooth surfaces for sterilization and polymer coating. Micrographs of porous magnesium implant were obtained by SEM (FEI Quanta 400 FEG, FEI Company, Hillsboro (Oregon), USA).

4.2. Dip-Coating Process for Applying Polymeric Coatings to Porous Titanium Scaffolds

After purification of titanium scaffolds in isopropanol, a manual dip-coating process, for which a specially designed sample holder was developed, was established. 2 mL of polymer solutions with a concentration of 0.4 % (w) of either PCL or P (3HB) in chloroform were used for each scaffold and filled into the dipping tanks adapted for the application. The dipping process was repeated six times with intermediate drying for 10 min at 23 ± 2 °C after each dipping process. The coated titanium scaffolds were then finally dried in a vacuum at 40 °C for 24 h.

Characterization of coated porous titanium scaffolds.

The surface morphology of the polymer-coated titanium scaffolds was assessed at different sites in order to test for complete surface coverage and to compare with the non-coated control scaffolds using an environmental scanning electron microscopy (Quanta FEG 250, FEI, Eindhoven, The Netherlands) equipped with an energy-dispersive x-ray (EDX) analysis unit. The scaffolds were fixed with conductive tape on aluminum trays and the scanning electron micrographs were taken at 50 Pa pressure in a moisturized atmosphere and an accelerating high voltage of 10 kV. The presence or absence of the polymeric coatings was assessed by EDX measurements performed at the beam entrance of the electron microscope. For element (Ti, C) determination, the spectra of the fibers bombarded with electrons were analyzed.

4.3. Spray-Coating Process for Application of Polymeric Coatings to Flat Magnesium Structures for the In Vitro Corrosion

Flat magnesium structures were coated with PCL by means of a spray-coating process for which a specially designed spray-coating device was developed by the Institute for Implant Technology and Biomaterials (IIB e.V., Rostock, Germany). A PCL solution with concentrations of 1.53 g/L of PCL dissolved in chloroform was used. For each structure, a coating with an absolute mass of 300 µg was applied. After coating, the magnesium structures were dried in a vacuum at 40 °C for 24 h. The coating mass of the dried PCL coatings was determined by using a Mettler Toledo UMX 5 Ultra-micro Balance (Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Germany).

4.4. In Vitro Corrosion Study

For investigating the *in vitro* corrosion behavior of magnesium structures prior to and after polymer coating, coated and non-coated samples (n = 3 samples per time point) were placed in a test tube containing 2 mL of Sørensen buffer (0.1 M, pH 7.4) and kept at 37 °C under gentle shaking. Samples were periodically removed, washed with distilled water and dried in a vacuum before analysis. The buffer solution was exchanged twice per week.

4.5. Gravimetry

To evaluate the magnesium corrosion by determining mass loss, the washed and dried samples (n = 3 samples per time point) were weighed using a special accuracy balance (UMX 5 Mettler Toledo, Switzerland). The mass loss was determined as the mass at time t divided by the initial mass multiplied by 100.

4.6. PH Value Measurement

Polymer samples (n = 3) were stored in 2 mL of Sørensen buffer (0.1 M, pH 7.4) at 37 °C under gentle shaking and the pH values were measured at different time points by means of a pH meter (Seven Easy pH Meter S20, Schwerzenbach, Switzerland).

4.7. Scanning Electron Microscopy and EDX Measurements

The surface morphology and the chemical surface composition of the PCL-coated magnesium structures were assessed after the different corrosion intervals (1, 3, and 21 days,

respectively), and compared to uncoated controls using an environmental scanning electron microscopy and EDX –measurements. Conditions as described above were applied.

4.8. Cell Culture

4.8.1. Murine GFP–MSC Isolation

Sterile fat tissue from the inguinal region was taken from GFP*C57Bl6 mice. The fresh sample was placed in Hank´s medium (HBBS). Then it was washed with PBS and minced into small pieces using a scalpel. To produce smaller pieces the sample was mixed with 3–4 mL Collagenase NB 8 (Serva, Heidelberg, Germany) followed by an incubation lasting 1 h at 37°C and 5% CO₂ using the Macs Mix™ Tube Rotator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

The suspension together with 5mL DMEM and 10% FCS was then centrifuged (1000rpm; 10min). After resuspending the cell pellet with 1mL of DEMEM and 10% FCS, the suspension was transferred to a 25 cm² culture flask containing 4 mL DMEM with FCS. When adherent cells reached 80% confluence they were passaged using TrypLE™ Express (Invitrogen, Darmstadt, Germany).

4.8.2. Murine GFP–Osteoblast and Murine Osteoblast Isolation

Cells were isolated using adult C57Bl6 mice or GFP*C57Bl6 mice as described before [45]. Mouse calvaria was minced carefully into small pieces using 200 U/mL collagenase II (Cell Systems, Troisdorf, Germany) in HBSS. Calvarias of ten mice were pooled and 5 mL collagenase solution was added at 37 °C for 10 min and repeated five times. Only supernatant of the previous three steps was used for further centrifugation (1200 rpm, 7 min). After two washing steps with culture medium, the cells were plated and incubated at 37°C and 8.5% CO₂.

For further cell culture, DMEM and 10% FCS, 20 mM HEPES, 1000 IU/ml penicillin and 0.1mg/ml streptomycin (all PAA Laboratories GmbH, Coelbe, Germany) were used. Media changing was performed every 3rd day until they were confluent.

For all further cell experiments culture medium was DMEM with 10% fetal calf serum. Conditions of incubation were 37°C and 5% CO₂.

4.9. LCI of Titanium Implant Seeded with GFP–MSC or GFP–Osteoblast

Titanium scaffolds coated with either PCL or P (3HB) were placed in a 96 well plate filled with 150 µl DMEM and 10% FCS. GFP–MSC of passage 2 (P 2) were added gently on the top

of the scaffolds at a concentration of $2.5 \cdot 10^4$ cells/ 150 μ l medium in triplicate. After 5h incubation period at 37°C, 5% CO₂ the implants were turned upside down to visualize the cells in the inverse microscope, and put into new wells that were prepared with purpose-built Teflon-slices used for lifting the scaffolds to create a gap between cells growing on the scaffolds and the bottom of the culture plates. Then proliferation and motility of the cells could be observed by Live Cell Imaging Microscope (DMI6000 B, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) during seven days with the program LAS AF 2.6.0. For every implant we took a picture of the same position every 15 minutes. A constant temperature of 37°C was achieved by using a heating unit and CO₂ atmosphere.

GFP-osteoblasts (P 9) were treated in a similar manner by using $2.5 \cdot 10^4$ cells/150 μ l medium. Cells at the same concentration without scaffolds and Teflon-slices were used as control. Cell count and cell size were examined by Wimasis Image Analysis GmbH.

4.10. LCI of Magnesium Hybrid Construct Seeded with GFP-Osteoblast

After establishing LCI of titanium implants, we used magnesium implants seeded with GFP-osteoblasts. Three scaffolds were incubated in a 6 well plate for 24h using culture medium (DMEM with 10% FCS).

Then GFP-osteoblasts were seeded in the same concentration as before with 78125 cells/ 1cm² surface area onto the scaffolds and as control on the well plate. After one hour of cell adhesion implants were placed in the scaffold holder created for the 6 well plate. The scaffold holder was prepared to ensure a good gas exchange so that the pH value was not partially increased. Further examination was done as described above, but only for one construct. Here, every time the same position was imaged. Imaging of different positions would have lead to medium movement, which would have resulted in faster magnesium corrosion. Therefore, the other constructs were imaged at five different random fields every day. Cell count and cell size were examined by Wimasis Image Analysis GmbH, Munich, Germany.

4.11. Proliferation Assay and Vitality Assay with Murine Osteoblasts

We used CFSE Proliferation Kit (life technologies, Darmstadt, Germany) following the manufacturer's guidelines. After mobilizing $1 \cdot 10^6$ murine osteoblasts, P9 or P10 cells were resuspended with 500 μ l prewarmed PBS/1%BSA. 5 μ M CFSE was added to a further 500 μ l of PBS/1%BSA. Both solutions were mixed together to achieve fast and even staining. Cell suspension was incubated at 37°C for 10 minutes and then staining was stopped by adding 5mL ice cold DMEM with 10% FKS. After 5 minutes storage on ice-water the suspension was centrifuged (10min, 1000rpm) and washed three times with culture medium. We performed

four wells of a 96 well plate with a polymer foil for each sample and took three samples for each experiment. This experimental set-up was used for PCL, P (3HB) and normal well bottom. To keep the foil attached to the well bottom a Teflon ring was used. For each experiment we used 3 approaches: $1 \cdot 10^4$ stained cells were added to each polymer foil. For positive control we used four wells with a normal well bottom with $1 \cdot 10^4$ cells seeded and had 1–3 approaches. Here, we used the Teflon ring as well to ensure that it does not influence in anyway the results. For negative control we added chill protect plus medium (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) to the cells, which were then stored in the fridge. To confirm that there was no autofluorescence we took one sample using cells without staining.

After three days the assay was stopped. Samples were then washed with PBS and trypsinized. The collected cells were stained with TO-PRO®-3 Stain (life technologies, Darmstadt, Germany), a death staining and then analyzed in FACS calibur (BD, Heidelberg, Germany).

4.12. Proliferation Assay and Vitality Assay with Murine GFP–MSC

For murine GFP–MSC, we could not use the CFSE kit due to the heterogeneous cell size that resulted in highly different fluorescent intensity of one generation.

We settled $1 \cdot 10^4$ GFP–MSC P7 to PCL, P (3HB) and normal well bottom in 96–well–plate as before. Two wells represented one sample. Three samples represented one experiment. After two days we stopped proliferation by washing with PBS and trypsination. The living and dead cells were then counted in FACS calibur after staining with TO-PRO®-3 Stain.

4.13. Single Cell Force Spectroscopy (SCFS)

Petri dishes (Biochrom/TPP, Berlin, Germany) with 34 mm diameter were coated with PCL and P(3HB) by spray coating. After sterilization with 70% alcohol for 5 min, rinsing with distilled water several times and with PBS two times, a Petri dish coated with both polymers including also non-coated areas (native Petri dish surface) was placed over an inverted optical microscope (Axio observer D1, Zeiss, Jena, Germany) by employing the Petri dish heater (PDH, JPK–Instruments AG, Berlin, Germany). Two milliliters of the experimental medium containing 96% v/v CO₂–independent medium (Invitrogen), 2% v/v fetal bovine serum (FCS; Biochrom) and 2% v/v stable glutamine (Biochrom AG) were placed in the Petri dish and the temperature was set to 37 °C. A clean fibronectin (from human plasma, Biochrom) coated tipless cantilever (Arrow–TL1, Nanoworld AG, Switzerland) with a nominal force constant of 0.03 N/m was installed on the atomic force microscope (AFM; NanoWizard II, JPK–Instruments AG) and was inserted gently into the medium. The cantilevers were coated

beforehand with, a drop of fibronectin (diluted in PBS to an end concentration of 0.15 mg/mL) for 30 min at 37°C in a humid environment in order to secure strong adhesion of single osteoblasts to the cantilevers. In order to avoid large thermal drifts during the experiment, the cantilevers were allowed to rest in the experimental medium at 37 °C for at least 45 minutes. Thereafter, the sensitivity and force constant of the cantilever were measured in situ using the thermal noise method [46]. Cells were trypsinized by employing standard protocol and a small amount (ca. 100 µl) of cell suspension was then placed in the Petri dish and a single round medium-sized cell was attached to the front tip of the cantilever by pressing it onto the cell using a constant force of 2 nN for 10 seconds. The single osteoblast was allowed to adhere to the cantilever for 10 min before the experiment began. For the experiments, cells were allowed to adhere to PCL, P(3HB) or Petri dish surfaces at different positions for either 5 or 180 seconds. All experiments were performed in constant force modus by using a set point of 1 nN to maintain the contact between cells and surfaces during the experiment. Cells were extended towards and retracted from the surfaces using a constant velocity of 2.5 µm/s. For 180 seconds 13 cells were measured and for 5 seconds 9 cells. Each position per cell was repeated three times.

For all experiments the constant force mode was used with a constant force of 14.5mN/m and a velocity of 2.4 µm/sec. The setpoint was 1nN.

The JPK SPM software (JPK–Instruments AG, vers. 4.3.25) was used for analyzing the force–displacement curves. Cell adhesion was determined by maximum peak of the retraction curve.

4.14. Statistical Analysis

Statistical analyses of data were performed using SAS® software, Version 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The experimental data were shown as mean ± standard deviation. The *p*-value < 0.05 was considered statistically significant.

5. Supplementary Materials

LCI of Magnesium Hybrid Construct Seeded with GFP–Osteoblast

Video S1: Magnesium hybrid construct seeded with GFP–osteoblasts_day 7

6. Conclusions

P(3HB) could not produce a continuous layer on magnesium and titanium. Especially a continuous coating is essential for a slower corrosion rate of magnesium. In cell cultures P(3HB) showed only slightly better results than PCL. Therefore, PCL coating should be preferred. Porous titanium implants coated with polymers as well as magnesium hybrid

constructs could successfully be vitalized and examined with LCI for one week. Porous magnesium implant was produced having a defined open porous structure and can be used for further studies.

Acknowledgments

The authors would like to thank Deutsche Forschungsgemeinschaft (German Research Foundation, DFG) for their funding and support of the project listed under support code NO 299/11-1.

Author Contributions

Ingo Nolte, Hugo Murua Escobar, Heinz Haferkamp, Nils-Claudius Gellrich primary study design, manuscript editing and final approval. Julia Matena, Svea Petersen, Matthias Gieseke, Pooyan Alouis, Günter Reuter, Andreas Kampmann, Michael Teske performed experiments. Julia Matena, Svea Petersen, Martin Beyerbach analysed the data. Julia Matena, Svea Petersen, Pooyan Alouis, Matthias Gieseke wrote the manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References and Notes

1. Gellrich, N.C.; Held, U.; Schoen, R.; Pailing, T.; Schramm, A.; Bormann, K.H. Alveolar zygomatic buttress: A new donor site for limited preimplant augmentation procedures. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* **2007**, *65*, 275-280.
2. Silber, J.S.; Anderson, D.G.; Daffner, S.D.; Brislin, B.T.; Leland, J.M.; Hilibrand, A.S.; Vaccaro, A.R.; Albert, T.J. Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. *Spine* **2003**, *28*, 134-139.
3. Sasso, R.C.; LeHuec, J.C.; Shaffrey, C. Iliac crest bone graft donor site pain after anterior lumbar interbody fusion: A prospective patient satisfaction outcome assessment. *Journal of spinal disorders & techniques* **2005**, *18 Suppl*, S77-81.
4. Davies, J.E.; Matta, R.; Mendes, V.C.; Perri de Carvalho, P.S. Development, characterization and clinical use of a biodegradable composite scaffold for bone engineering in oro-maxillo-facial surgery. *Organogenesis* **2010**, *6*, 161-166.
5. Yang, S.; Wang, J.; Tang, L.; Ao, H.; Tan, H.; Tang, T.; Liu, C. Mesoporous bioactive glass doped-poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) composite scaffolds with 3-dimensionally hierarchical pore networks for bone regeneration. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **2014**, *116*, 72-80.

6. Willbold, E.; Gu, X.; Albert, D.; Kalla, K.; Bobe, K.; Brauneis, M.; Janning, C.; Nellesen, J.; Czayka, W.; Tillmann, W., *et al.* Effect of the addition of low rare earth elements (lanthanum, neodymium, cerium) on the biodegradation and biocompatibility of magnesium. *Acta biomaterialia* **2015**, *11*, 554-562.
7. Waizy, H.; Seitz, J.-M.; Reifenrath, J.; Weizbauer, A.; Bach, F.-W.; Meyer-Lindenberg, A.; Denkena, B.; Windhagen, H. Biodegradable magnesium implants for orthopedic applications. *J Mater Sci* **2013**, *48*, 39-50.
8. Shadanbaz, S.; Walker, J.; Woodfield, T.B.; Staiger, M.P.; Dias, G.J. Monetite and brushite coated magnesium: In vivo and in vitro models for degradation analysis. *Journal of materials science. Materials in medicine* **2014**, *25*, 173-183.
9. Chen, Y.; Song, Y.; Zhang, S.; Li, J.; Zhao, C.; Zhang, X. Interaction between a high purity magnesium surface and pcl and pla coatings during dynamic degradation. *Biomedical materials (Bristol, England)* **2011**, *6*, 025005.
10. Xu, L.; Yamamoto, A. Characteristics and cytocompatibility of biodegradable polymer film on magnesium by spin coating. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **2012**, *93*, 67-74.
11. Centeno-Leija, S.; Huerta-Beristain, G.; Giles-Gomez, M.; Bolivar, F.; Gosset, G.; Martinez, A. Improving poly-3-hydroxybutyrate production in escherichia coli by combining the increase in the nadph pool and acetyl-coa availability. *Antonie van Leeuwenhoek* **2014**, *105*, 687-696.
12. Shishatskaya, E.I.; Kamendov, I.V.; Starosvetsky, S.I.; Vinnik, Y.S.; Markelova, N.N.; Shageev, A.A.; Khorzhevsky, V.A.; Peryanova, O.V.; Shumilova, A.A. An in vivo study of osteoplastic properties of resorbable poly-3-hydroxybutyrate in models of segmental osteotomy and chronic osteomyelitis. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology (Print)* **2013**.
13. Ring, A.; Langer, S.; Homann, H.H.; Kuhnen, C.; Schmitz, I.; Steinau, H.U.; Drucke, D. Analysis of neovascularization of pegt/pbt-copolymer dermis substitutes in balb/c-mice. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* **2006**, *32*, 35-41.
14. Artel, A.; Mehdizadeh, H.; Chiu, Y.C.; Brey, E.M.; Cinar, A. An agent-based model for the investigation of neovascularization within porous scaffolds. *Tissue engineering. Part A* **2011**, *17*, 2133-2141.
15. Zhu, K.; Li, C.; Zhu, Z.; Liu, C.S. Measurement of the dynamic young's modulus of porous titanium and ti6al4v. *J Mater Sci* **2007**, *Volume 42*, 7348-7353.
16. Jauer, L.; Meiners, W.; Poprawe, R. Selective laser melting of biodegradable metals. *European Cells and Materials* **2013**, *26*, 21.
17. Rakhmatia, Y.D.; Ayukawa, Y.; Furuhashi, A.; Koyano, K. Current barrier membranes: Titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *Journal of prosthodontic research* **2013**, *57*, 3-14.
18. Wang, Y.; Shen, Y.; Wang, Z.; Yang, J.; Liu, N.; Huang, W. Development of highly porous titanium scaffolds by selective laser melting. *Materials Letters* **2010**, *64*, 674-676.

19. Van der Stok, J.; Van der Jagt, O.P.; Amin Yavari, S.; De Haas, M.F.; Waarsing, J.H.; Jahr, H.; Van Lieshout, E.M.; Patka, P.; Verhaar, J.A.; Zadpoor, A.A., *et al.* Selective laser melting-produced porous titanium scaffolds regenerate bone in critical size cortical bone defects. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **2013**, *31*, 792-799.
20. Sallica-Leva, E.; Jardini, A.L.; Fogagnolo, J.B. Microstructure and mechanical behavior of porous ti-6al-4v parts obtained by selective laser melting. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* **2013**, *26*, 98-108.
21. Aliuos, P.; Sen, A.; Reich, U.; Dempwolf, W.; Warnecke, A.; Hadler, C.; Lenarz, T.; Menzel, H.; Reuter, G. Inhibition of fibroblast adhesion by covalently immobilized protein repellent polymer coatings studied by single cell force spectroscopy. *Journal of biomedical materials research. Part A* **2013**.
22. Mueller, W.D.; Lucia Nascimento, M.; Lorenzo de Mele, M.F. Critical discussion of the results from different corrosion studies of mg and mg alloys for biomaterial applications. *Acta biomaterialia* **2010**, *6*, 1749-1755.
23. Sanchez, A.H.M.; Luthringer, B.J.C.; Feyerabend, F.; Willumeit, R. Mg and mg alloys: How comparable are in vitro and in vivo corrosion rates? A review. *Acta biomaterialia* **2015**, *13*, 16-31.
24. Scheideler, L.; Fuger, C.; Schille, C.; Rupp, F.; Wendel, H.P.; Hort, N.; Reichel, H.P.; Geis-Gerstorfer, J. Comparison of different in vitro tests for biocompatibility screening of mg alloys. *Acta biomaterialia* **2013**, *9*, 8740-8745.
25. Kruth, J.P.; Froyen, L.; Van Vaerenbergh, J.; Mercelis, P.; Rombouts, M.; Lauwers, B. Selective laser melting of iron-based powder. *Journal of Materials Processing Technology* **2004**, *149*, 616-622.
26. Murray, J.L.; Wriedt, H.A. The o-ti (oxygen-titanium) system. *JPE* **1987**, *8*, 148-165.
27. Louvis, E.; Fox, P.; Sutcliffe, C.J. Selective laser melting of aluminium components. *Journal of Materials Processing Technology* **2011**, *211*, 275-284.
28. Vandenbroucke, B.; Kruth, J.P. Selective laser melting of biocompatible metals for rapid manufacturing of medical parts. *Rapid Prototyping Journal* **2007**, *13*, 196-203.
29. Wriedt, H.A. The mg-o (magnesium-oxygen) system. *Bulletin of Alloy Phase Diagrams* **1987**, *8*, 227-233.
30. Niemeyer, M. *Strahl-stoff-wechselwirkung und resultierende verbindungseigenschaften beim laserstrahlschweißen von magnesiumlegierungen*. Fortschrittberichte VDI, 1999; Vol. Grund-und Werkstoffe/Kunststoffe.
31. Bennett, J.H.; Moffatt, S.; Horton, M. Cell adhesion molecules in human osteoblasts: Structure and function. *Histology and histopathology* **2001**, *16*, 603-611.
32. Brynda, E.; Pachernik, J.; Houska, M.; Pientka, Z.; Dvorak, P. Surface immobilized protein multilayers for cell seeding. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2005**, *21*, 7877-7883.

33. Hagihara, K.; Fujii, K.; Matsugaki, A.; Nakano, T. Possibility of mg- and ca-based intermetallic compounds as new biodegradable implant materials. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* **2013**, *33*, 4101-4111.
34. Willbold, E.; Kalla, K.; Bartsch, I.; Bobe, K.; Brauneis, M.; Remennik, S.; Shechtman, D.; Nellesen, J.; Tillmann, W.; Vogt, C., *et al.* Biocompatibility of rapidly solidified magnesium alloy rs66 as a temporary biodegradable metal. *Acta biomaterialia* **2013**, *9*, 8509-8517.
35. Pichler, K.; Kraus, T.; Martinelli, E.; Sadoghi, P.; Musumeci, G.; Uggowitzner, P.J.; Weinberg, A.M. Cellular reactions to biodegradable magnesium alloys on human growth plate chondrocytes and osteoblasts. *International orthopaedics* **2014**, *38*, 881-889.
36. Virtanen, S. Biodegradable mg and mg alloys: Corrosion and biocompatibility. *Materials Science and Engineering: B* **2011**, *176*, 1600-1608.
37. Wang, J.; Qin, L.; Wang, K.; Wang, J.; Yue, Y.; Li, Y.; Tang, J.; Li, W. Cytotoxicity studies of az31d alloy and the effects of carbon dioxide on its biodegradation behavior in vitro. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* **2013**, *33*, 4416-4426.
38. Seuss, F.; Seuss, S.; Turhan, M.C.; Fabry, B.; Virtanen, S. Corrosion of mg alloy az91d in the presence of living cells. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **2011**, *99*, 276-281.
39. Johnson, I.; Perchy, D.; Liu, H. In vitro evaluation of the surface effects on magnesium-yttrium alloy degradation and mesenchymal stem cell adhesion. *Journal of biomedical materials research. Part A* **2011**.
40. Williams, J.M.; Adewunmi, A.; Schek, R.M.; Flanagan, C.L.; Krebsbach, P.H.; Feinberg, S.E.; Hollister, S.J.; Das, S. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials* **2005**, *26*, 4817-4827.
41. Witte, F.; Ulrich, H.; Rudert, M.; Willbold, E. Biodegradable magnesium scaffolds: Part 1: Appropriate inflammatory response. *Journal of biomedical materials research. Part A* **2007**, *81*, 748-756.
42. Witte, F.; Ulrich, H.; Palm, C.; Willbold, E. Biodegradable magnesium scaffolds: Part ii: Peri-implant bone remodeling. *Journal of biomedical materials research. Part A* **2007**, *81*, 757-765.
43. Wulf, K.; Teske, M.; Lobler, M.; Luderer, F.; Schmitz, K.P.; Sternberg, K. Surface functionalization of poly(epsilon-caprolactone) improves its biocompatibility as scaffold material for bioartificial vessel prostheses. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **2011**, *98*, 89-100.
44. Giannoudis, P.V.; Einhorn, T.A.; Marsh, D. Fracture healing: The diamond concept. *Injury* **2007**, *38 Suppl 4*, S3-6.
45. Chen, X.D.; Qian, H.Y.; Neff, L.; Satomura, K.; Horowitz, M.C. Thy-1 antigen expression by cells in the osteoblast lineage. *Journal of bone and mineral research : the*

official journal of the American Society for Bone and Mineral Research **1999**, *14*, 362-375.

46. Butt, H.J.; Jaschke, M. Calculation of thermal noise in atomic-force microscopy. *Nanotechnology* **1995**, *6*, 1-7.

6 Diskussion

Das Versagen von Implantaten und die nicht optimale Rekonstruktion kritisch großer Schädeldefekte geht meist auf eine nicht angepasste Knochenheilung zurück. Dieser Prozess ist im Wesentlichen vom Umfang der Vaskularisation abhängig (SARAN et al. 2014). Knochenimplantate müssen ausreichend stabil gefertigt sein, um den lokal wirkenden Kräften Stand zu halten (LUO et al. 2012). Resorbierbare Implantate sollen die Nachteile eines permanenten Implantates, welches zu einer zweiten Operation mit Implantatentfernung führen kann, umgehen (SCHUMANN et al. 2013). Magnesium als resorbierbarer, biokompatibler Werkstoff mit einer dem Knochen vergleichbaren Stabilität wird als Material der Wahl geprüft (WAIZY et al. 2013).

Ziel der vorliegenden Studie war es daher, konventionellen Titanwerkstoff mit dem resorbierbaren Werkstoff Magnesium in vitro zu vergleichen. Die Polymere PCL und P(3HB) wurden auf ihre Eignung für Implantatbeschichtungen geprüft. Verschiedene Faktoren (VEGF, HMGB1 und CXCL12) wurden auf Ihre proangiogene Wirkung untersucht. Im Mittelpunkt dieser Studie standen umfassende Untersuchungen über das Wachstumsverhalten von Zellen auf den verschiedenen Implantaten.

Hier lag die Herausforderung darin, die Zellen in Echtzeit auf den opaken Implantaten mikroskopisch verfolgen zu können. Dafür eignete sich die Methode der Langzeit-Zellbeobachtung mittels Live Cell Imaging (LCI). Hierfür wurde eine selbst entwickelte Teflonhalterung genutzt, die es ermöglichte Zellen auch auf opaken Materialien zu beobachten. Die Implantate wurden mit Osteoblasten oder Fettstammzellen besiedelt, welche über die Expression eines grün fluoreszierendes Proteins (GFP) sichtbar waren, und in der speziellen Teflonhalterung über dem Boden der Wellplatte fixiert. Es war durch das Verfahren möglich, dieselbe Implantatposition über die Zeit verfolgen zu können und somit die Zellen in Echtzeit zu beobachten. Sowohl Vitalität, Migration, Morphologie als auch die Zellzahl konnten ohne weitere Manipulation der Zellen beobachtet werden. Herkömmliche Methoden verwenden eine Fixierung der Zellen mit anschließender bildlicher Darstellung, wobei lediglich ein Zeitpunkt der einzelnen Zellaktivität dargestellt werden kann (JOHNSON et al. 2011; GALLI et al. 2013; WANG et al. 2013; SOLA-RUIZ et al. 2014). Das LCI bietet daher die einzigartige Möglichkeit, eine realitätsnahe Zellverfolgung auf opakem Material durchzuführen. Insbesondere für den Werkstoff Magnesium ist die Methode von Vorteil. Oft wird Magnesium nur indirekt geprüft, indem es auf dem Zellkulturboden angehefteten Zellen als Mediumüberstand angeboten wird (HAGIHARA et al. 2013; WILLBOLD et al. 2013). Bei diesen indirekten Methoden fehlt der Einfluss der Zelladhäsion auf dem zu prüfenden Werkstoff. Ebenso ist der chemische Einfluss auf die Zellen direkt auf dem Implantat nicht vergleichbar mit dem Überstand korrodierten Magnesiums. Es konnte

in einer Studie gezeigt werden, dass der pH-Wert auf der Magnesiumoberfläche größer als der durchschnittliche Wert im umgebenden Medium ist (VIRTANEN 2011).

Das LCI wurde in der Studie 1 erstmalig mit Osteoblasten auf dem Titanimplantat vorgestellt. In der Studie 2 wurde das Titanimplantat mit dem PCL-beschichteten Titanimplantat verglichen, da sich die veränderten Oberflächeneigenschaften des beschichteten Implantates, auf die Zellanheftung und Vitalität auswirken können. Um die möglichen Auswirkungen zu charakterisieren wurde ein LCI über 7 Tage durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse des LCI schloss Zellzahl und Zellfläche ein, sowie deren Entwicklung über die Zeit. Die Daten der Zellparameter über die Zeit stellen die Besonderheit des LCI dar, wobei über einen längeren Zeitraum eine Implantatposition mit denselben Zellen dargestellt werden kann. So konnte gezeigt werden, dass die Zellzahl auf dem PCL-beschichteten Implantat signifikant niedriger war als auf dem reinen Titanimplantat. Dies lässt sich mit dem hydrophoben Charakter des PCLs erklären (SHEIKH et al. 2009). Die Ergebnisse der Zellzahl führen zu der Annahme, dass die PCL-beschichteten Implantate nicht uneingeschränkt für Osteoblasten geeignet sind. In einer in vivo-Studie von Williams et al. wurde jedoch ein Knochenaufbau bei PCL-beschichteten Implantaten belegt (WILLIAMS et al. 2005). Dies kann damit zusammenhängen, dass sich über die Zeit Extrazelluläre Matrix (ECM) Proteine an die Implantatoberfläche anheften und somit eine Zelladhäsion verbessern (BRYNDA et al. 2005). In der Literatur wird diskutiert, dass der Proliferationsindex von Osteoblasten durch die Verbindungen mit ECM Molekülen wie verschiedene Integrinbindungen mit Fibronectin, Osteopontin und Typ 1 Kollagen beeinflusst wird (BENNETT et al. 2001). In der vorliegenden Studie hat sich die Zellfläche über die Zeit auf den PCL-beschichteten Implantaten vergrößert. Zellen auf den unbeschichteten Titanimplantaten zeigten keine starke Zellflächenveränderung. Eine mögliche Erklärung der steigenden Zellflächenvergrößerung auf dem PCL ist ebenfalls die in der Literatur beschriebene indirekte Bindung der Zellen mit ECM Proteinen, welche sich mit der Zeit auf den Implantatoberflächen anheften (BRYNDA et al. 2005). Für die vorliegenden Ergebnisse kann vermutet werden, dass die PCL-Oberfläche durch eine Proteinanlagerung über die Zeit die Zellanheftung verbessern kann und zu einer Zellflächenvergrößerung führt. Auch die Ergebnisse der Zellzahlentwicklung, welche für beide Materialien ähnlich war, belegen die Vermutung. Eine Einschränkung hat die Methode der Zellflächenmessung jedoch. Sofern unterschiedlich reflektierende Materialien gegenüber gestellt werden, ist auch die Zellgröße nicht direkt zu vergleichen, da die Zellen größer oder kleiner erscheinen. Die Entwicklung der Zellfläche über die Zeit kann jedoch gut verglichen werden. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Zellzahlbestimmung allein nicht ausreichend für den Vergleich verschiedener Materialien ist. In der Literatur wird die Zellzahl oft nur zu einem Zeitpunkt gemessen, bedingt durch die für die Auswertung nötige Fixierung

der Zellen (JOHNSON et al. 2011; GALLI et al. 2013; WANG et al. 2013; SOLA-RUIZ et al. 2014). Die hier genutzte zusätzliche vergleichende Auswertung der Zellzahleentwicklung und Zellflächenentwicklung konnte das Zellverhalten auf den Materialien besser wiedergeben.

Da PCL ein synthetisch hergestelltes Material ist, wurde hier vermutet, dass das biologisch hergestellte Polymer P(3HB) die Biokompatibilität verbessern kann (CHEN et al. 2011; CENTENO-LEIJA et al. 2014). Die beiden Polymere PCL und P(3HB) wurden in der Studie 3 als Beschichtung auf dem Titanimplantat mittels LCI geprüft. Zusätzlich wurden die Polymere einzeln in Form einer Polymerfolie über herkömmliche Proliferations- und Vitalitätsassays sowie über SCFS untersucht, um den alleinigen Einfluss der jeweiligen Polymere auf die Zellen zu erfassen. Auf beiden polymerbeschichteten Titanimplantaten konnten mittels LCI ein gutes Osteoblastenwachstum über eine Woche nachgewiesen werden. Die Besiedlung mit Fettstammzellen führte jedoch auf PCL im Vergleich zu P(3HB) nach 6 Tagen zu einer Abrundung der Zellen, mit schlechter Oberflächenanheftung. Nach 7 Tagen war die Zellzahl reduziert. Über das LCI konnte so das Zellverhalten bei Ablösung vom Implantat visualisiert werden. Die Proliferations- und Vitalitätsassays zeigten übereinstimmend mit den Ergebnissen aus dem LCI, für P(3HB) eine tendenziell bessere, jedoch nicht signifikante, Vitalität der Zellen im Vergleich zu PCL. Da mit diesen Methoden keine signifikanten Ergebnisse erzielt wurden, wurde hier zusätzlich SCFS genutzt. SCFS kann die Adhäsionskraft der Zellen auf unterschiedlichen Materialien bestimmen (ALIUOS et al. 2013). Osteoblasten konnten mit dieser Methode geprüft werden. Die Fettstammzellen waren aufgrund ihrer heterogenen Zellgröße nicht geeignet für dieses Verfahren. Jedoch zeigten auch die Osteoblasten mit dieser Methode für die Polymere keine signifikanten Unterschiede.

Unabhängig vom Zellverhalten auf den Polymeren soll das Polymer nach Beschichtung einen gleichmäßigen Überzug bei offener Porenstruktur gewährleisten. Darüber soll einerseits ein vollständiger Korrosionsschutz erzielt werden und andererseits die Porengröße von 250 μm erhalten bleiben, um den in der Literatur beschriebenen optimalen Raum für einsprossende Gefäße und wachsenden Knochen zu gewährleisten (ARTEL et al. 2011). Mit EDX und ESEM Messung gelang es, eine ebene Beschichtung und eine offene Porenstruktur für PCL, nicht aber für P(3HB), nachzuweisen. Die Tauchbeschichtung von offenporigen Titanimplantaten mit PCL kann somit die aufgestellten Forderungen erfüllen.

Die Herstellung der beiden zu testenden Titan- und Magnesiumimplantate erfolgte in der vorliegenden Studie über SLM, wobei übereinstimmend mit der Literatur für Titan viele Geometrien möglich sind, die Verarbeitung mit Magnesium jedoch noch weiterer Forschung bedarf, um feinere Strukturen herstellen zu können (VANDENBROUCKE

u. KRUTH 2007; JAUER et al. 2013). Das hier in der Studie 3 mittels SLM generierte Magnesium wurde daher in einer vereinfachten Struktur plan auf einen Titangrundkörper, welcher zur Unterstützung der feinen Magnesiumstruktur diente, aufgearbeitet. Eine PCL-Beschichtung wurde über das Sprühverfahren aufgetragen. Eine mögliche korrosionshemmende Wirkung der Beschichtung wurde im Vergleich zu unbeschichteten Konstrukten geprüft. Die Korrosion wurde über pH- und Masse-Entwicklung der Konstrukte über 21 Tage in Medium untersucht. Bei der vorliegenden Studie wurde eine leichte, gleichmäßige Mediumbewegung erzeugt, wobei die Flussgeschwindigkeit nicht gemessen wurde. Nach Auswertung der Ergebnisse konnte die Korrosionsgeschwindigkeit von SLM-generierten Magnesiumhybridkonstrukten durch die PCL-Beschichtung herab gesetzt werden. In einer anderen Studie wurde jedoch gezeigt, dass nach PCL-Beschichtung unter simuliertem Blutfluss ein Stent aus hochreinem Magnesium nicht gegen Korrosion geschützt war (CHEN et al. 2011). Des weiteren zeigten Untersuchungen einer anderen Studie mit auf PCL-Basis beschichteten Magnesiumimplantaten in vitro wiederum eine reduzierte Korrosionsrate und induzierten im Knochendefekt eine verstärkte Knochenneubildung im Vergleich zu unbeschichteten Implantaten (WONG et al. 2010; JO et al. 2013). Diese Ergebnisse deuten auf eine strenge Indikation für eine Beschichtung je nach Einsatzgebiet des Implantates hin.

Zusammengenommen bestätigen die Ergebnisse des LCI, Proliferationsassays, Vitalitätsassays, Korrosions- und Beschichtungsversuchs in der eigenen Untersuchung PCL als geeignete Polymerbeschichtung für das SLM-generierte Magnesiumkonstrukt.

Um den Einfluss des PCL-beschichteten Magnesiumhybridkonstrukts auf Zellen zu prüfen, wurde es mit einem PCL-beschichteten Titanimplantat nach Osteoblastenbesiedlung mittels LCI verglichen. Obwohl die Zellzahl auf dem Magnesiumhybridkonstrukt nach 2 Tagen signifikant niedriger war, zeigte sich eine gute Zelladhäsion über den Beobachtungszeitraum einer Woche durch Auswertung der Zellflächen- und Zellzahlentwicklung. Möglicherweise steht die niedrigere Zellzahl im Zusammenhang mit der einsetzenden Magnesiumkorrosion. Da entsprechend eine Gasentwicklung zu beobachten war, ist anzunehmen, dass einige Zellen von der Oberfläche durch das Gas abgelöst wurden, ohne jedoch die Vitalität der restlichen Zellen zu beeinträchtigen. Diese Ergebnisse bestärken den Nutzen der sich ergänzenden Betrachtung von Zellzahl- und Zellflächenentwicklung über die Zeit mit dem LCI.

Mit dem SLM Verfahren war es nach erfolgreicher Prüfung des Magnesiumhybridkonstruktes möglich das geforderte offenporige Magnesiumimplantat zu generieren. Das hier geprüfte über SLM hergestellte

Magnesiumimplantat hatte eine Porengröße von 600 μm . Es wurde nach PCL-Beschichtung mit dem ebenfalls PCL-beschichteten Titanimplantat mittels LCI verglichen, wobei die Ergebnisse nicht in die Studien eingegangen sind. Hier war wie zuvor auf dem Magnesiumhybridkonstrukt eine niedrigere Zellzahl auf dem Magnesiumimplantat im Vergleich zu dem Titanimplantat zu beobachten. Die Zellzahlentwicklung auf dem Magnesiumimplantat war über die Zeit von Tag 1 bis Tag 7 ähnlich den Ergebnissen des Titanimplantates. Auch die Entwicklung der Zellfläche über die Zeit war vergleichbar auf den beiden Implantaten.

Das LCI ermöglicht die Verfolgung von Zellen auf der Implantatoberfläche. Um aber Zellen auch in der Porenstruktur visualisieren zu können, müssen andere Methoden eingesetzt werden, was in der Studie 2 diskutiert wurde. Die Verfolgung der Zellen in die Tiefe ist notwendig, da nicht nur die Implantatoberfläche, sondern auch die offenporige Implantatstruktur mit Zellen durchbaut werden soll, um die Knochen-Implantat-Verbindung zu vergrößern. Da die geforderte Porengröße von 250 μm bisher mit Magnesium noch nicht erreicht ist, wurde Titan genutzt, um die Porengeometrie zu prüfen. Um dies nachzuvollziehen, wurden die Implantate mit primären Osteoblasten besiedelt und deren Einwuchsverhalten über 7 Tage verfolgt. Herkömmliche Assays zur Evaluation der Zellen in porösen Materialien bestimmen den DNA-Gehalt ohne Aussage zur Lokalisation und Anheftung der Zellen in den Poren (AMIN YAVARI et al. 2014). Über histologische Schnitte kann auch die Zelllokalisierung beschrieben werden (MULLER et al. 2006). In der eigenen Studie konnten durch histologische Schnitte der Implantate und Verwendung von GFP-Osteoblasten die fluoreszierenden Zellen in den Poren nachgewiesen werden und ergänzend die Zellfläche, als auch die mittlere Migration der Zellen über 7 Tage verfolgt werden. Die Zellfläche hat sich dabei nach 7 Tagen signifikant vergrößert. Eine Proliferation der Zellen innerhalb der Porenstruktur konnte nachgewiesen werden. Somit war auch in der Porenstruktur eine ausreichende nutritive Versorgung der Zellen gegeben und es hefteten sich nach der Besiedlung genügend Zellen an. Es kann vermutet werden, dass die kleine Porengröße von 250 μm die Zellanheftung verbessert hat. Dies konnte auch in einer früheren Studie gezeigt werden, in der die Zellzahl höher bei 500 μm im Vergleich zu einer 1000 μm Porengröße war (VAN BAEL et al. 2012). Die in dieser Studie genutzte regelmäßige Porenstruktur hat vermutlich ebenfalls zu einer verstärkten Zellbesiedlung in den Poren geführt. Denn in einer anderen Studie wurde unter gleichen Zellkulturbedingungen eine unregelmäßige und verzweigte Porenstruktur verwendet, die zu einem Wachsen der Zellen auf der Implantatoberfläche nicht aber im Inneren der Poren führte (MULLER et al. 2006). Hier ist SLM von Vorteil, da dieses Verfahren die Herstellung von gleichmäßigen Strukturen ermöglicht (VANDENBROUCKE u. KRUTH 2007).

Eine gerichtete Migration der Zellen weiter in das Implantat hinein wurde in dieser Arbeit nach Auswertung der Histologie nicht nachgewiesen. Dies war auch nicht zu erwarten, da keine Migrationsfaktoren eingesetzt wurden. Da eine gezielte Migration der Zellen in die inneren Strukturen des Implantates eine beschleunigte Durchbauung mit Knochen verspricht, wurden verschiedene Faktoren in der Studie 1 und 2 untersucht (VAN DER STOK et al. 2013b). Insbesondere proangiogene Faktoren sind zu Beginn der Einheilung grundlegend, wobei besonders bei großen Knochendefekten eine schnelle Gefäßsprossung wichtig ist (LASCHKE et al. 2008). PCL bietet hier neben den nachgewiesenen korrosionshemmenden Eigenschaften die Möglichkeit zur Inkorporation von derartigen Faktoren (NIU et al. 2014; XIAO et al. 2014). Hervorzuheben ist, dass in der vorliegenden Studie die Endothelzelllinie GM7373 im Migrationsassay eine höhere Migrationseffizienz bei Zugabe von HMGB1 erzielte, als die Referenzprobe mit VEGF. Dies ist von großer Bedeutung, da VEGF einer der am häufigsten verwendeten proangiogenen Faktoren ist (ZACHARY 2003; POH et al. 2010). Für die weitere Untersuchung des chemotaktischen Potentials von HMGB1 müssten primäre Endothelzellen geprüft werden sowie eine in vivo-Untersuchung folgen. Eine gesteigerte Chemotaxis sollte laut Literatur durch die Kombination von HMGB1 und CXCL12 erfolgen, wobei eine enge Verbindung der beiden Faktoren bereits bei Mesoangioblasten, Monozyten, Macrophagen und Fibroblasten gezeigt wurde (PALUMBO et al. 2007; KEW et al. 2012; SCHIRALDI et al. 2012). Dabei wurde deutlich, dass HMGB1 und CXCL12 über einen Heterokomplex an CXC-Motiv-Chemokinrezeptor (CXCR4) binden (SCHIRALDI et al. 2012). In der vorliegenden Studie konnte herausgearbeitet werden, dass HMGB1 in Kombination mit CXCL12 eine vergleichbare Chemotaxis induziert, wie die Kombination von HMGB1 mit VEGF. In diesen Kombinationsassays lag jeweils nur die Hälfte der Einzelkonzentrationen vor. Das könnte der Grund dafür sein, dass der Kombinationsansatz weniger chemotaktisch wirksam war als HMGB1 alleine. Dennoch wurde deutlich, dass wegen der herausragenden Migrationseffizienz von HMGB1 im Vergleich zu VEGF, dieser Faktor ein großes Potential als proangiogener Faktor besitzt.

Um einen möglichen Einfluss von HMGB1 und VEGF auf Osteoblasten zu untersuchen, wurden diese in der Studie 1 ebenfalls im Migrationsassay geprüft. Die verwendeten murinen Osteoblasten zeigten eine vermehrte Chemotaxis bei Zugabe von HMGB1, wohingegen VEGF keinen Effekt hatte. Dies stimmt mit Ergebnissen aus vorherigen Studien überein, wobei humane Osteoblasten, nicht aber murine Osteoblasten bei Zugabe von VEGF eine erhöhte Migration zeigten (MAYR-WOHLFART et al. 2002; FUKUYAMA et al. 2004).

Mit der vorliegenden Untersuchung erwies sich das LCI als eine potente Methode, Zellen in Echtzeit auf opaken Materialien verfolgen zu können. Ergänzende

histologische Schnitte ermöglichen in vitro wichtige zusätzliche Informationen zum Zellwachstum in der Tiefe. Nach erfolgter Prävitalisierung muss allerdings eine mögliche Verbesserung der knöchernen Einheilung in vivo noch erfolgen. Ein über SLM generiertes, offenporiges Magnesiumimplantat mit PCL-Beschichtung und HMGB1 Inkorporation zeigte zumindest in der eigenen Untersuchung vielversprechende Ergebnisse und ist damit ein geeigneter Ansatz, resorbierbare und gleichzeitig stabile Implantate herzustellen, die auch kritische Schädeldefekte decken und einheilen.

7 Zusammenfassung

Julia Matena

Entwicklung und in vitro-Prüfung von Implantatkonstrukten für kritische Defekte im Schädelbereich

Implantate für den Kopfbereich nach schweren Verletzungen und Tumoroperationen sollen dem Defekt entsprechend patientenindividuell gestaltbar sein und neben der temporären Stabilität schnell durchbaut werden. Ab einer kritischen Größe eines Defekts reicht das Potenzial der physiologischen Knochenneubildung meist nicht, weil die Vaskularisation nicht adäquat schnell einsetzt. Nach einer ausreichenden Osteosynthese ist das Implantat entbehrlich und meist sogar störend. Aus diesem Grund werden Implantate in der Regel im Rahmen einer Zweitoperation erneut traumatisierend entfernt. Ein Implantat mit ausreichender Stabilität für die Primärversorgung, das wie Magnesium später resorbiert wird, wäre daher wünschenswert. Verschiedene Aspekte, Implantate für kritisch große Gesichtsschädeldefekte zu konzipieren, wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Zunächst wurde das Zellwachstum auf Titanoberflächen verfolgt, die über einen selektiven Laserschmelzprozess (SLM) formindividuell hergestellt worden waren. Bis in den μm -Bereich ließen sich dadurch formvorgegebene Strukturen schaffen.

Über das hier verwendete SLM-Verfahren konnten somit patientenindividuelle Geometrien aus Titan angefertigt werden. Dabei ließen sich $250\mu\text{m}$ große Poren in das Metall einarbeiten, in denen fluoreszierende Osteoblasten proliferierten.

Ergänzend wurde die Titanoberfläche mit einem Polycaprolacton-Polmer (PCL) beschichtet mit dem Ziel, verschiedene proangiogene Faktoren aufzunehmen. Da die im Vergleich zur porösen Titanoberfläche veränderte Polymer-Oberfläche einen Einfluss auf das Zellwachstum haben kann, wurde zunächst das Osteoblastenwachstum über die Zeit in vitro mikroskopisch betrachtet (Live Cell Imaging, LCI). Dabei war die Entwicklung des Zellwachstums und der Zellfläche über den beobachteten Zeitraum auf der Polymeroberfläche nur unwesentlich schwächer als auf porösem, unbeschichtetem Titan.

Von den geprüften proangiogenen Faktoren High-Mobility-Group-Protein B1 (HMGB1), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und CXC-Motiv-Chemokin 12 (CXCL12) zeigte das HMGB1 den stärksten Einfluss auf die Migration von Endothelzellen und bietet sich daher als Kofaktor an, um in polymerbeschichteten

Implantaten die Vaskularisation zu beschleunigen. Mit dem SLM-Verfahren wurden, über die Titanimplantate hinaus, Implantate aus Magnesium für die in vitro-Zellwachstumsstudien angefertigt. Um die frühzeitige Resorption des Magnesiums zu verhindern und um Wachstumsfaktoren gezielt zum Implantat einzubringen, wurde vergleichend eine Beschichtung mit PCL und P(3HB) (Polyhydroxybutyrat) aufgebracht. Unter dem LCI wurde das Proliferations- und Migrationsverhalten von Osteoblasten und Fettstammzellen verfolgt.

Über die PCL-Beschichtung konnte die Korrosion des Magnesiums hinausgezögert werden und das in vitro charakterisierte Zellwachstum deutet auf eine gute Biokompatibilität hin.

8 Summary

Julia Matena

Development and in vitro examination of implant constructs for critical sized defects in the skull

Craniofacial implants, needed after serious injuries or tumor surgery, should be reconstructed patient individual to match the defect contour. A temporary stability should be maintained during a preferably fast bone remodeling. Above a critical sized defect physiological bone growth is limited due to insufficient vascularization. Once osteosynthesis is satisfactorily completed, the implant itself is dispensable and usually irritating. For this reason implants usually are removed in a second surgery. Sufficiently stable implants for primary care, that could be resorbed comparable to magnesium, are favorable. In the present study different concepts have been examined, that meet the requirements at the critical sized craniofacial bone defects.

The cell growth was imaged on titanium surface, that was manufactured patient individually by Selective Laser Melting (SLM). A defined structure could be manufactured to the μm -range.

This SLM method offers a patient individual titanium implant production. A porous structure of 250 μm pore size was realized, where fluorescent osteoblasts were able to proliferate.

Additionally, the titanium implant was coated with a polymer (polycaprolactone, PCL), to enable proangiogenic factor incorporation. As cell growth on the coated titanium surface could be different to the uncoated implant, the different implant materials were compared in the cell culture using osteoblasts with the Live Cell Imaging method (LCI). The development of cell count and cell size, that were examined during the imaging period, were slightly weaker on the PCL coated titanium implant.

Among the tested proangiogenic factors high-mobility-group-protein B1 (HMGB1), vascular endothelial growth factor (VEGF) and CXC-motif-chemokine 12 (CXCL12) the HMGB1 showed highest cell migration values for endothelial cells. This indicates that it could be potential to incorporate factors into the polymer coating to improve vascularisation.

Besides titanium implants, magnesium implants were successfully manufactured using SLM and could be examined in in vitro studies. The implants were coated with the

polymer PCL or P(3HB) (polyhydroxybutyrate) to prevent magnesium from fast corrosion and to enable factor incorporation. Proliferation and migration of osteoblasts and mesenchymal stem cells were imaged using the LCI.

The PCL coating could reduce the magnesium corrosion and the cell growth in vitro indicates a good biocompatibility.

9 Literaturverzeichnis

ALIUSO, P., A. SEN, U. REICH, W. DEMPWOLF, A. WARNECKE, C. HADLER, T. LENARZ, H. MENZEL u. G. REUTER (2013):

Inhibition of fibroblast adhesion by covalently immobilized protein repellent polymer coatings studied by single cell force spectroscopy.

J Biomed Mater Res A 102, 117-127

AMIN YAVARI, S., J. VAN DER STOK, Y. C. CHAI, R. WAUTHLE, Z. TAHMASEBI BIRGANI, P. HABIBOVIC, M. MULIER, J. SCHROOTEN, H. WEINANS u. A. A. ZADPOOR (2014):

Bone regeneration performance of surface-treated porous titanium.

Biomaterials 35, 6172-6181

ARTEL, A., H. MEHDIZADEH, Y. C. CHIU, E. M. BREY u. A. CINAR (2011):

An agent-based model for the investigation of neovascularization within porous scaffolds.

Tissue Eng Part A 17, 2133-2141

BAER, P. C. u. H. GEIGER (2012):

Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity.

Stem Cells Int 2012, 812693

BENNETT, J. H., S. MOFFATT u. M. HORTON (2001):

Cell adhesion molecules in human osteoblasts: structure and function.

Histol Histopathol 16, 603-611

BESSA, P. C., M. CASAL u. R. L. REIS (2008):

Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery).

J Tissue Eng Regen Med 2, 81-96

BONDARENKO, A., N. ANGRISANI, A. MEYER-LINDENBERG, J. M. SEITZ, H. WAIZY u. J. REIFENRATH (2014):

Magnesium-based bone implants: immunohistochemical analysis of peri-implant osteogenesis by evaluation of osteopontin and osteocalcin expression.

J Biomed Mater Res A 102, 1449-1457

BONDARENKO, A., M. HEWICKER-TRAUTWEIN, N. ERDMANN, N. ANGRISANI, J. REIFENRATH u. A. MEYER-LINDENBERG (2011):

Comparison of morphological changes in efferent lymph nodes after implantation of resorbable and non-resorbable implants in rabbits.

Biomed Eng Online 10, 32

BRIE, I. C., O. SORITAU, N. DIRZU, C. BERCE, A. VULPOI, C. POPA, M. TODEA, S. SIMON, M. PERDE-SCHREPLER, P. VIRAG, O. BARBOS, G. CHERECHES, P. BERCE u. V. CERNEA (2014):

Comparative in vitro study regarding the biocompatibility of titanium-base composites infiltrated with hydroxyapatite or silicitanate.

J Biol Eng 8, 14

BRYNDA, E., J. PACHERNIK, M. HOUSKA, Z. PIENKA u. P. DVORAK (2005):

Surface immobilized protein multilayers for cell seeding.

Langmuir 21, 7877-7883

CARANO, R. A. u. E. H. FILVAROFF (2003):

Angiogenesis and bone repair.

Drug Discov Today 8, 980-989

CENTENO-LEIJA, S., G. HUERTA-BERISTAIN, M. GILES-GOMEZ, F. BOLIVAR, G. GOSSET u. A. MARTINEZ (2014):

Improving poly-3-hydroxybutyrate production in Escherichia coli by combining the increase in the NADPH pool and acetyl-CoA availability.

Antonie Van Leeuwenhoek 105, 687-696

CHAYA, A., S. YOSHIZAWA, K. VERDELIS, N. MYERS, B. J. COSTELLO, D. T. CHOU, S. PAL, S. MAITI, P. N. KUMTA u. C. SFEIR (2015a):

In vivo study of magnesium plate and screw degradation and bone fracture healing.

Acta Biomater

CHAYA, A., S. YOSHIZAWA, K. VERDELIS, S. NOORANI, B. J. COSTELLO u. C. SFEIR (2015b):

Fracture healing using degradable magnesium fixation plates and screws.

J Oral Maxillofac Surg 73, 295-305

CHEN, Y., Y. SONG, S. ZHANG, J. LI, C. ZHAO u. X. ZHANG (2011):

Interaction between a high purity magnesium surface and PCL and PLA coatings during dynamic degradation.

Biomed Mater 6, 025005

CHENARD, K. E., C. M. TEVEN, T. C. HE u. R. R. REID (2012):

Bone morphogenetic proteins in craniofacial surgery: current techniques, clinical experiences, and the future of personalized stem cell therapy.

J Biomed Biotechnol 2012, 601549

COWAN, C. M., Y. Y. SHI, O. O. AALAMI, Y. F. CHOU, C. MARI, R. THOMAS, N. QUARTO, C. H. CONTAG, B. WU u. M. T. LONGAKER (2004):

Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects.

Nat Biotechnol 22, 560-567

DAVIES, J. E., R. MATTA, V. C. MENDES u. P. S. PERRI DE CARVALHO (2010):

Development, characterization and clinical use of a biodegradable composite scaffold for bone engineering in oro-maxillo-facial surgery.

Organogenesis 6, 161-166

DE GIGLIO, E., S. COMETA, M. A. RICCI, A. ZIZZI, D. CAFAGNA, S. MANZOTTI, L. SABBATINI u. M. MATTIOLI-BELMONTE (2010):

Development and characterization of rhVEGF-loaded poly(HEMA-MOEP) coatings electrosynthesized on titanium to enhance bone mineralization and angiogenesis.

Acta Biomater 6, 282-290

DECKERS, M. M., R. L. VAN BEZOOIJEN, G. VAN DER HORST, J. HOOGEN DAM, C. VAN DER BENT, S. E. PAPAPOULOS u. C. W. LOWIK (2002):

Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A.

Endocrinology 143, 1545-1553

DRUECKE, D., S. LANGER, E. LAMME, J. PIEPER, M. UGARKOVIC, H. U. STEINAU u. H. H. HOMANN (2004):

Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo: Long-term investigations using intravital fluorescent microscopy.

J Biomed Mater Res A 68A, 8

EL-GHANNAM, A., A. HART, D. WHITE u. L. CUNNINGHAM (2013):

Mechanical properties and cytotoxicity of a resorbable bioactive implant prepared by rapid prototyping technique.

J Biomed Mater Res A 101, 2851-2861

EL-HAJJE, A., E. C. KOLOS, J. K. WANG, S. MALEKSAEEDI, Z. HE, F. E. WIRIA, C. CHOONG u. A. J. RUYS (2014):

Physical and mechanical characterisation of 3D-printed porous titanium for biomedical applications.

J Mater Sci Mater Med 25, 2471-2480

ERDMANN, N., N. ANGRISANI, J. REIFENRATH, A. LUCAS, F. THOREY, D. BORMANN u. A. MEYER-LINDENBERG (2011):

Biomechanical testing and degradation analysis of MgCa_{0.8} alloy screws: a comparative in vivo study in rabbits.

Acta Biomater 7, 1421-1428

FARZADI, A., M. SOLATI-HASHJIN, M. ASADI-EYDIVAND u. N. A. ABU OSMAN (2014):

Effect of layer thickness and printing orientation on mechanical properties and dimensional accuracy of 3D printed porous samples for bone tissue engineering.

PLoS One 9, e108252

FU, Q., M. N. RAHAMAN, B. S. BAL, R. F. BROWN u. D. E. DAY (2008):

Mechanical and in vitro performance of 13-93 bioactive glass scaffolds prepared by a polymer foam replication technique.

Acta Biomater 4, 1854-1864

FU, Y., Q. ZHANG, Y. SUN, W. LIAO, X. BAI, L. ZHANG, L. DU, Y. JIN, Q. WANG, Z. LI u. Y. WANG (2014):

Controlled-release of bone morphogenetic protein-2 from a microsphere coating applied to acid-etched Ti6AL4V implants increases biological bone growth in vivo.

J Orthop Res 32, 744-751

FUKUYAMA, R., T. FUJITA, Y. AZUMA, A. HIRANO, H. NAKAMUTA, M. KOIDA u. T. KOMORI (2004):

Statins inhibit osteoblast migration by inhibiting Rac-Akt signaling.

Biochem Biophys Res Commun 315, 636-642

GALLI, C., M. PIERGIANNI, M. PIEMONTESE, S. LUMETTI, F. RAVANETTI, A. CACCHIOLI, G. M. MACALUSO u. G. PASSERI (2013):

Periostin improves cell adhesion to implantable biomaterials and osteoblastic differentiation on implant titanium surfaces in a topography-dependent fashion.

J Biomed Mater Res A 102, 3855-3861

GITTARD, S. D., A. KOROLEVA, A. K. NGUYEN, E. FADEEVA, A. GAIDUKEVICIUTE, S. SCHLIE-WOLTER, R. J. NARAYAN u. B. CHICHKOV (2013):

Two-photon polymerization microstructuring in regenerative medicine.

Front Biosci (Elite Ed) 5, 602-609

GUILLAUME, O.; X. GARRIC; J.P. LAVIGNE, H. VAN DEN BERGHE u. J. COUDANE (2012):

Multilayer, degradable coating as a carrier for the sustained release of antibiotics: Preparation and antimicrobial efficacy in vitro.

J Control Release 162, 492-501

HAGIHARA, K., K. FUJII, A. MATSUGAKI u. T. NAKANO (2013):

Possibility of Mg- and Ca-based intermetallic compounds as new biodegradable implant materials.

Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 33, 4101-4111

HORCH, H.-H. u. C. PAUTKE (2006):

Regeneration statt Reparation.

Mund Kiefer Gesichtschir 10, 213-220

HUEHNERSCHULTE, T. A., J. REIFENRATH, B. VON RECHENBERG, D. DZIUBA, J. M. SEITZ, D. BORMANN, H. WINDHAGEN u. A. MEYER-LINDENBERG (2012):

In vivo assessment of the host reactions to the biodegradation of the two novel magnesium alloys ZEK100 and AX30 in an animal model.

Biomed Eng Online 11, 14

JAUER, L., W. MEINERS u. R. POPRAWE (2013):
Selective laser melting of biodegradable metals.
Eur Cell Mater 26, 21

JI, Y., L. WANG, D. C. WATTS, H. QIU, T. YOU, F. DENG u. X. WU (2014):
Controlled-release naringin nanoscaffold for osteoporotic bone healing.
Dent Mater 30, 1263-1273

JO, J. H., Y. LI, S. M. KIM, H. E. KIM u. Y. H. KOH (2013):
Hydroxyapatite/poly(epsilon-caprolactone) double coating on magnesium for
enhanced corrosion resistance and coating flexibility.
J Biomater Appl 28, 617-625

JOHNSON, I., D. PERCHY u. H. LIU (2011):
In vitro evaluation of the surface effects on magnesium-yttrium alloy degradation and
mesenchymal stem cell adhesion.
J Biomed Mater Res A 100, 477-485

JUN, S. H., E. J. LEE, T. S. JANG, H. E. KIM, J. H. JANG u. Y. H. KOH (2013):
Bone morphogenic protein-2 (BMP-2) loaded hybrid coating on porous hydroxyapatite
scaffolds for bone tissue engineering.
J Mater Sci Mater Med 24, 773-782

KEW, R. R., M. PENZO, D. M. HABEL u. K. B. MARCU (2012):
The IKKalpha-dependent NF-kappaB p52/RelB noncanonical pathway is essential to
sustain a CXCL12 autocrine loop in cells migrating in response to HMGB1.
J Immunol 188, 2380-2386

KLAMMERT, U., U. GBURECK, E. VORNDRAN, J. RODIGER, P. MEYER-
MARCOTTY u. A. C. KUBLER (2010):
3D powder printed calcium phosphate implants for reconstruction of cranial and
maxillofacial defects.
J Craniomaxillofac Surg 38, 565-570

KOROLEVA, A., A. DEIWICK, A. NGUYEN, S. SCHLIE-WOLTER, R. NARAYAN, P.
TIMASHEV, V. POPOV, V. BAGRATASHVILI u. B. CHICHKOV (2015):
Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in 3-d zr-si organic-
inorganic scaffolds produced by two-photon polymerization technique.
PLoS One 10, e0118164

LASCHKE, M. W., M. RUCKER, G. JENSEN, C. CARVALHO, R. MULHAUPT, N. C.
GELLRICH u. M. D. MENGER (2008):
Improvement of vascularization of PLGA scaffolds by inosculation of in situ-preformed
functional blood vessels with the host microvasculature.
Ann Surg 248, 939-948

LAURENCIN, C., Y. KHAN u. S. F. EL-AMIN (2006):

Bone graft substitutes.

Expert Rev Med Devices 3, 49-57

LETHAUS, B., M. BLOEBAUM, D. KOPER, M. POORT-TER LAAK u. P. KESSLER (2014):

Interval cranioplasty with patient-specific implants and autogenous bone grafts--success and cost analysis.

J Craniomaxillofac Surg 42, 1948-1951

LEVI, B., A. W. JAMES, E. R. NELSON, D. VISTNES, B. WU, M. LEE, A. GUPTA u. M. T. LONGAKER (2010):

Human adipose derived stromal cells heal critical size mouse calvarial defects.

PLoS One 5, e11177

LINDHORST, D., F. TAVASSOL, C. VON SEE, P. SCHUMANN, M. W. LASCHKE, Y. HARDER, K. H. BORMANN, H. ESSIG, H. KOKEMULLER, A. KAMPMANN, A. VOSS, R. MULHAUPT, M. D. MENGER, N. C. GELLRICH u. M. RUCKER (2010):

Effects of VEGF loading on scaffold-confined vascularization.

J Biomed Mater Res A 95, 783-792

LUO, J., B. LIU, Z. XIE, S. DING, Z. ZHUANG, L. LIN, Y. GUO, H. CHEN u. X. YU (2012):

Comparison of manually shaped and computer-shaped titanium mesh for repairing large frontotemporoparietal skull defects after traumatic brain injury.

Neurosurg Focus 33, E13

MAO, J. J., W. V. GIANNOBILE, J. A. HELMS, S. J. HOLLISTER, P. H. KREBSBACH, M. T. LONGAKER u. S. SHI (2006):

Craniofacial tissue engineering by stem cells.

J Dent Res 85, 966-979

MAYR-WOHLFART, U., J. WALTENBERGER, H. HAUSSER, S. KESSLER, K. P. GUNTHER, C. DEHIO, W. PUHL u. R. E. BRENNER (2002):

Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts.

Bone 30, 472-477

MULLER, D., H. CHIM, A. BADER, M. WHITEMAN u. J. T. SCHANTZ (2010):

Vascular guidance: microstructural scaffold patterning for inductive neovascularization.

Stem Cells Int 2011, 547247

MULLER, U., T. IMWINKELRIED, M. HORST, M. SIEVERS u. U. GRAF-HAUSNER (2006):

Do human osteoblasts grow into open-porous titanium?

Eur Cell Mater 11, 8-15

NAKAMURA, Y., S. SUZUKI, T. SHIMIZU, M. MIYATA, T. SHISHIDO, K. IKEDA, S. I. SAITOH, I. KUBOTA u. Y. TAKEISHI (2015):
High Mobility Group Box 1 Promotes Angiogenesis from Bone Marrow-derived Endothelial Progenitor Cells after Myocardial Infarction.
J Atheroscler Thromb 22

NG, C. C., M. M. SAVALANI, M. L. LAU u. H. C. MAN (2011):
Microstructure and mechanical properties of selective laser melted magnesium.
Appl Surf Sci 257, 7447-7454

NG, C. C., M. M. SAVALANI, H. C. MAN u. I. GIBSON (2010):
Layer manufacturing of magnesium and its alloy structures for future applications.
Virtual Phys Prototyp 5, 13-19

NGUYEN, T. L., M. P. STAIGER, G. J. DIAS u. T. B. F. WOODFIELD (2011):
A Novel Manufacturing Route for Fabrication of Topologically-Ordered Porous Magnesium Scaffolds.
Adv Eng Mater 13, 872-881

NIINOMI, M. (1998):
Mechanical properties of biomedical titanium alloys.
Mater Sci Eng: A 243, 231-236

NIU, X., C. YANG, D. CHEN, S. HE, D. YAN u. Y. YAO (2014):
Impact of drug-eluting stents with different coating strategies on stent thrombosis: A meta-analysis of 19 randomized trials.
Cardiol J 21, 557-568

PALUMBO, R., B. G. GALVEZ, T. PUSTERLA, F. DE MARCHIS, G. COSSU, K. B. MARCU u. M. E. BIANCHI (2007):
Cells migrating to sites of tissue damage in response to the danger signal HMGB1 require NF-kappaB activation.
J Cell Biol 179, 33-40

PILIPCHUK, S. P., A. B. PLONKA, A. MONJE, A. D. TAUT, A. LANIS, B. KANG u. W. V. GIANNOBILE (2015):
Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity.
Dent Mater 31, 317-338

POH, C. K., Z. SHI, T. Y. LIM, K. G. NEOH u. W. WANG (2010):
The effect of VEGF functionalization of titanium on endothelial cells in vitro.
Biomaterials 31, 1578-1585

REHMAN, J., D. TRAKTUEV, J. LI, S. MERFELD-CLAUSS, C. J. TEMM-GROVE, J. E. BOVENKERK, C. L. PELL, B. H. JOHNSTONE, R. V. CONSIDINE u. K. L. MARCH (2004):
Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells.

Circulation 109, 1292-1298

REIFENRATH, J., A. KRAUSE, D. BORMANN, B. VON RECHENBERG, H. WINDHAGEN u. A. MEYER-LINDENBERG (2010):

Profound differences in the in-vivo-degradation and biocompatibility of two very similar rare-earth containing Mg-alloys in a rabbit model.

Materialwiss Werkstofftech 41, 1054-1061

ROGERS, G. F. u. A. K. GREENE (2012):

Autogenous bone graft: basic science and clinical implications.

J Craniofac Surg 23, 323-327

ROHNER, D., D. W. HUTMACHER, T. K. CHENG, M. OBERHOLZER u. B. HAMMER (2003):

In vivo efficacy of bone-marrow-coated polycaprolactone scaffolds for the reconstruction of orbital defects in the pig.

J Biomed Mater Res B Appl Biomater 66, 574-580

ROSENTHAL, G., I. NG, S. MOSCOVICI, K. K. LEE, T. LAY, C. MARTIN u. G. T. MANLEY (2014):

Polyetheretherketone implants for the repair of large cranial defects: a 3-center experience.

Neurosurgery 75, 523-529; discussion 528-529

ROTARU, H., R. SCHUMACHER, S. G. KIM u. C. DINU (2015):

Selective laser melted titanium implants: a new technique for the reconstruction of extensive zygomatic complex defects.

Maxillofac Plast Reconstr Surg 37, 1

ROTARU, H., H. STAN, I. S. FLORIAN, R. SCHUMACHER, Y. T. PARK, S. G. KIM, H. CHEZAN, N. BALC u. M. BACIUT (2012):

Cranioplasty with custom-made implants: analyzing the cases of 10 patients.

J Oral Maxillofac Surg 70, e169-176

RYAN, G., A. PANDIT u. D. P. APATSIDIS (2006):

Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications.

Biomaterials 27, 2651-2670

SARAN, U., S. GEMINI PIPERNI u. S. CHATTERJEE (2014):

Role of angiogenesis in bone repair.

Arch Biochem Biophys 561, 109-117

SASSO, R. C., J. C. LEHUEC u. C. SHAFFREY (2005):

Iliac crest bone graft donor site pain after anterior lumbar interbody fusion: a prospective patient satisfaction outcome assessment.

J Spinal Disord Tech 18 Suppl, S77-81

- SAVALANI, M. M., C. C. NG u. H. C. MAN (2010):
Selective laser melting of Magnesium for Future Applications in the Medicine.
In: International Conference on Manufacturing Automation (ICMA), Hong Kong 2010,
S. 50 - 54
- SCHIRALDI, M., A. RAUCCI, L. M. MUNOZ, E. LIVOTI, B. CELONA, E. VENEREAU,
T. APUZZO, F. DE MARCHIS, M. PEDOTTI, A. BACHI, M. THELEN, L. VARANI, M.
MELLADO, A. PROUDFOOT, M. E. BIANCHI u. M. UGUCCIONI (2012):
HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a
complex with CXCL12 and signaling via CXCR4.
J Exp Med 209, 551-563
- SCHLIEPHAKE, H., J. RUBBLACK, A. FORSTER, B. SCHWENZER, J. REICHERT u.
D. SCHARNWEBER (2015):
Functionalization of titanium implants using a modular system for binding and release
of VEGF enhances bone implant contact in a rodent model.
J Clin Periodontol 42, 302-310
- SCHUMACHER, S., J. STAHL, W. BAUMER, J. M. SEITZ, F. W. BACH, L. J.
PETERSEN u. M. KIETZMANN (2011):
Ex vivo examination of the biocompatibility of biodegradable magnesium via
microdialysis in the isolated perfused bovine udder model.
Int J Artif Organs 34, 34-43
- SCHUMANN, P., D. LINDHORST, M. E. WAGNER, A. SCHRAMM, N. C. GELLRICH
u. M. RUCKER (2013):
Perspectives on resorbable osteosynthesis materials in craniomaxillofacial surgery.
Pathobiology 80, 211-217
- SCOLOZZI, P. (2012):
Maxillofacial reconstruction using polyetheretherketone patient-specific implants by
"mirroring" computational planning.
Aesthetic Plast Surg 36, 660-665
- SEBAA, M.; T.Y. NGUYEN, S. DHILLON, S. GARCIA u. H. LIU (2015):
The effects of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) coating on magnesium degradation
and cytocompatibility with human embryonic stem cells for potential neural
applications.
J Biomed Mater Res A 103, 25-37
- SEITZ, J.-M., K. COLLIER, E. WULF, D. BORMANN u. F.-W. BACH (2011):
Comparison of the Corrosion Behavior of Coated and Uncoated Magnesium Alloys in
an In Vitro Corrosion Environment.
Adv Eng Mater 13, B313-B323
- SHADANBAZ, S., J. WALKER, T. B. WOODFIELD, M. P. STAIGER u. G. J. DIAS
(2014):

Monetite and brushite coated magnesium: in vivo and in vitro models for degradation analysis.

J Mater Sci Mater Med 25, 173-183

SHAH, A. M., H. JUNG u. S. SKIRBOLL (2014):

Materials used in cranioplasty: a history and analysis.

Neurosurg Focus 36, E19

SHEIKH, F., N. M. BARAKAT, M. KANJWAL, S. ARYAL, M. KHIL u. H.-Y. KIM (2009):
Novel self-assembled amphiphilic poly(ϵ -caprolactone)-grafted-poly(vinyl alcohol) nanoparticles: hydrophobic and hydrophilic drugs carrier nanoparticles.

J Mater Sci Mater Med 20, 821-831

SHEN, X., P. MA, Y. HU, G. XU, J. ZHOU u. K. CAI (2015):

Mesenchymal stem cell growth behavior on micro/nano hierarchical surfaces of titanium substrates.

Colloids Surf B Biointerfaces 127c, 221-232

SKARDAL, A. u. A. ATALA (2014):

Biomaterials for Integration with 3-D Bioprinting.

Ann Biomed Eng 43, 730-746

SOLA-RUIZ, M. F., C. PEREZ-MARTINEZ, J. J. MARTIN-DEL-LLANO, C. CARDA-BATALLA u. C. LABAIG-RUEDA (2014):

In vitro preliminary study of osteoblast response to surface roughness of titanium discs and topical application of melatonin.

Med Oral Patol Oral Cir Bucal 20, 88-93

STREET, J., M. BAO, L. DEGUZMAN, S. BUNTING, F. V. PEALE, JR., N. FERRARA, H. STEINMETZ, J. HOEFFEL, J. L. CLELAND, A. DAUGHERTY, N. VAN BRUGGEN, H. P. REDMOND, R. A. CARANO u. E. H. FILVAROFF (2002):

Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover.

Proc Natl Acad Sci U S A 99, 9656-9661

TAN, L., M. GONG, F. ZHENG, B. ZHANG u. K. YANG (2009):

Study on compression behavior of porous magnesium used as bone tissue engineering scaffolds.

Biomed Mater 4, 015016

TAN, L., Q. WANG, X. LIN, P. WAN, G. ZHANG, Q. ZHANG u. K. YANG (2014):

Loss of mechanical properties in vivo and bone-implant interface strength of AZ31B magnesium alloy screws with Si-containing coating.

Acta Biomater 10, 2333-2340

TAN, L., X. YU, P. WAN u. K. YANG (2013):

Biodegradable Materials for Bone Repairs: A Review.

J Mater Sci Technol 29, 503-513

TIAN, P., X. LIU u. C. DING (2015):

In vitro degradation behavior and cytocompatibility of biodegradable AZ31 alloy with PEO/HT composite coating.

Colloids Surf B Biointerfaces 128c, 44-54

VAN BAEL, S., Y. C. CHAI, S. TRUSCELLO, M. MOESEN, G. KERCKHOFS, H. VAN OOSTERWYCK, J. P. KRUTH u. J. SCHROOTEN (2012):

The effect of pore geometry on the in vitro biological behavior of human periosteum-derived cells seeded on selective laser-melted Ti6Al4V bone scaffolds.

Acta Biomater 8, 2824-2834

VAN DEN DOLDER, J., E. FARBER, P. H. SPAUWEN u. J. A. JANSEN (2003):

Bone tissue reconstruction using titanium fiber mesh combined with rat bone marrow stromal cells.

Biomaterials 24, 1745-1750

VAN DER STOK, J., O. P. VAN DER JAGT, S. AMIN YAVARI, M. F. DE HAAS, J. H. WAARSING, H. JAHR, E. M. VAN LIESHOUT, P. PATKA, J. A. VERHAAR, A. A. ZADPOOR u. H. WEINANS (2013a):

Selective laser melting-produced porous titanium scaffolds regenerate bone in critical size cortical bone defects.

J Orthop Res 31, 792-799

VAN DER STOK, J., H. WANG, S. AMIN YAVARI, M. SIEBELT, M. SANDKER, J. H. WAARSING, J. A. VERHAAR, H. JAHR, A. A. ZADPOOR, S. C. LEEUWENBURGH u. H. WEINANS (2013b):

Enhanced bone regeneration of cortical segmental bone defects using porous titanium scaffolds incorporated with colloidal gelatin gels for time- and dose-controlled delivery of dual growth factors.

Tissue Eng Part A 19, 2605-2614

VANDENBROUCKE, B. u. J. P. KRUTH (2007):

Selective laser melting of biocompatible metals for rapid manufacturing of medical parts.

Rapid Prototyping J 13, 196-203

VIRTANEN, S. (2011):

Biodegradable Mg and Mg alloys: Corrosion and biocompatibility.

Mater Sci Eng: B 176, 1600-1608

WAIZY, H., J. DIEKMANN, A. WEIZBAUER, J. REIFENRATH, I. BARTSCH, V. NEUBERT, R. SCHAVAN u. H. WINDHAGEN (2014):

In vivo study of a biodegradable orthopedic screw (MgYREZr-alloy) in a rabbit model for up to 12 months.

J Biomater Appl 28, 667-675

WAIZY, H., J.-M. SEITZ, J. REIFENRATH, A. WEIZBAUER, F.-W. BACH, A. MEYER-LINDENBERG, B. DENKENA u. H. WINDHAGEN (2013):
Biodegradable magnesium implants for orthopedic applications.
J Mater Sci 48, 39-50

WANG, J., L. QIN, K. WANG, J. WANG, Y. YUE, Y. LI, J. TANG u. W. LI (2013):
Cytotoxicity studies of AZ31D alloy and the effects of carbon dioxide on its biodegradation behavior in vitro.
Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 33, 4416-4426

WIEDING, J., T. LINDNER, P. BERGSCHMIDT u. R. BADER (2015):
Biomechanical stability of novel mechanically adapted open-porous titanium scaffolds in metatarsal bone defects of sheep.
Biomaterials 46, 35-47

WILLBOLD, E., X. GU, D. ALBERT, K. KALLA, K. BOBE, M. BRAUNEIS, C. JANNING, J. NELLESEN, W. CZAYKA, W. TILLMANN, Y. ZHENG u. F. WITTE (2015):
Effect of the addition of low rare earth elements (lanthanum, neodymium, cerium) on the biodegradation and biocompatibility of magnesium.
Acta Biomater 11, 554-562

WILLBOLD, E., K. KALLA, I. BARTSCH, K. BOBE, M. BRAUNEIS, S. REMENNIK, D. SHECHTMAN, J. NELLESEN, W. TILLMANN, C. VOGT u. F. WITTE (2013):
Biocompatibility of rapidly solidified magnesium alloy RS66 as a temporary biodegradable metal.
Acta Biomater 9, 8509-8517

WILLIAMS, J. M., A. ADEWUNMI, R. M. SCHEK, C. L. FLANAGAN, P. H. KREBSBACH, S. E. FEINBERG, S. J. HOLLISTER u. S. DAS (2005):
Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering.
Biomaterials 26, 4817-4827

WITTE, F., H. ULRICH, C. PALM u. E. WILLBOLD (2007a):
Biodegradable magnesium scaffolds: Part II: peri-implant bone remodeling.
J Biomed Mater Res A 81, 757-765

WITTE, F., H. ULRICH, M. RUDERT u. E. WILLBOLD (2007b):
Biodegradable magnesium scaffolds: Part 1: appropriate inflammatory response.
J Biomed Mater Res A 81, 748-756

WONG, H. M., K. W. YEUNG, K. O. LAM, V. TAM, P. K. CHU, K. D. LUK u. K. M. CHEUNG (2010):
A biodegradable polymer-based coating to control the performance of magnesium alloy orthopaedic implants.
Biomaterials 31, 2084-2096

WUST, S., M. E. GODLA, R. MULLER u. S. HOFMANN (2014):
Tunable hydrogel composite with two-step processing in combination with innovative hardware upgrade for cell-based three-dimensional bioprinting.
Acta Biomater 10, 630-640

XIAO, Y., M. YUAN, J. ZHANG, J. YAN u. M. LANG (2014):
Functional poly(epsilon-caprolactone) based materials: preparation, self-assembly and application in drug delivery.
Curr Top Med Chem 14, 781-818

XU, L., G. YU, E. ZHANG, F. PAN u. K. YANG (2007):
In vivo corrosion behavior of Mg-Mn-Zn alloy for bone implant application.
J Biomed Mater Res A 83, 703-711

YANG, J., R. SHAH, A. G. ROBLING, E. TEMPLETON, H. YANG, K. J. TRACEY u. J. P. BIDWELL (2008):
HMGB1 is a bone-active cytokine.
J Cell Physiol 214, 730-739

YANG, S., J. WANG, L. TANG, H. AO, H. TAN, T. TANG u. C. LIU (2014):
Mesoporous bioactive glass doped-poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) composite scaffolds with 3-dimensionally hierarchical pore networks for bone regeneration.
Colloids Surf B Biointerfaces 116, 72-80

YUSOP, A. H., A. A. BAKIR, N. A. SHAHAROM, M. R. ABDUL KADIR u. H. HERMAWAN (2012):
Porous biodegradable metals for hard tissue scaffolds: a review.
Int J Biomater 2012, 641430

ZACHARY, I. (2003):
VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology.
Biochem Soc Trans 31, 1171-1177

ZHANG, B., H. LIAO u. C. CODDET (2012):
Effects of processing parameters on properties of selective laser melting Mg-9%Al powder mixture.
Mater Des 34, 753-758

ZHU, K., C. LI, Z. ZHU u. C. S. LIU (2007):
Measurement of the dynamic Young's modulus of porous titanium and Ti6Al4V.
J Mater Sci 42, 7348-7353

10 Abkürzungsverzeichnis

2PP	2-Photonen-Polymerisation
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
EBM	Electron Beam Melting
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDX	energiedispersiver Röntgenspektroskopie
ESEM	spezieller Rasterelektronenmikroskop
FDM	Fused Deposition Modeling
FGF	Fibroblast Growth Factor
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein B1
IGF	Insulin-like Growth Factor
LCI	Live Cell Imaging
LENS	Laser engineered net Shaping
MAO	Micro-Arc Oxidation
P(3HB)	Polyhydroxybutyrat
PCL	Polycaprolacton
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PEDOT	Poly(3,4-ethylenedioxythiophen)
PGA	Polyglycolsäure
PLA	Poly lactide
PLGA	Poly lactid-co-Glykolid
SFF	Solid Freeform Fabrication
SLM	selektives Laserschmelzen
TGF	Transforming Growth Factor

TGF- β	Transforming Growth Factor- β
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

11 Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Professor Nolte für die Bereitstellung des Themas dieser sehr spannenden und lehrreichen Arbeit sowie die freundliche und engagierte Unterstützung. Insbesondere möchte ich mich bei Ihnen für die Ermöglichung der Kongressreisen sowie Weiterbildungen bedanken.

Ein spezieller Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. Murua Escobar, der trotz räumlicher Veränderungen immer ein offenes Ohr und sachkundige Ratschläge hatte.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Professor Nolte, Herrn Professor Haferkamp, Herrn Professor Gellrich, Frau Professor Sternberg, Herrn PD Dr. Murua Escobar, Herrn Gieseke, Herrn Dr. Kampmann, Frau Dr. Petersen, Herrn Dr. Teske, Frau Roland und Herrn Grau für die vielen produktiven Projekttreffen bedanken, die mit immer neuen Fragestellungen die Arbeit vorangetrieben haben.

Ein weiterer spezieller Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe Molekularbiologie, der Klinik für Kleintiere, Frau Dr. Willenbrock, Frau Roland, Herr Grau, Frau Hammer, Herrn Dr. Wagner, Frau Ripoli, Herrn Schille, Frau Liu, Frau Thiemeyer, Frau Mohr und Frau Anders. Vielen Dank für die tolle Zeit und eure Unterstützung.

Herrn Dr. Beyerbach möchte ich für die Unterstützung der statistischen Auswertungen und die spannenden Diskussionen danken.

Herrn Dr. Alouis möchte ich für die großartige Unterstützung mit dem AFM danken, an dem wir viele Wochenenden verbrachten sowie Herrn Professor Reuter für die Bereitstellung.

Meinen Freunden Anastasia, Anita, Anna, Caro, Ina, Julia, Karin, Laura, Lena, Magdalena, Marijke, Yuki und nicht zu vergessen Mara danke ich dafür, dass ihr immer Zeit gefunden habt, mich mit Rat und Tat zu unterstützen und vor allem für die Ablenkung jenseits der Doktorarbeit über alle Städte- und Ländergrenzen hinweg. Ein besonderer Dank gilt meinem Freund Christian für seinen Rat, seine Zuversicht und seine Liebe. Danke ihr Lieben!

Der größte Dank gebührt jedoch meiner Familie. Insbesondere danke ich meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Großeltern für ihre grenzenlose Unterstützung, ihre positiven Gedanken und ihre Liebe.