

*In vitro*-Tests für die  
Charakterisierung von Magnesium als  
resorbierbares Implantatmaterial

Vom Promotionsausschuss der  
Technischen Universität Hamburg-Harburg  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor-Ingenieurin  
genehmigte Dissertation

von  
Janine Fischer  
aus Flensburg

2014

Vorsitzender des Prüfungsausschusses:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

3. Gutachter:

Prof. Dr. Gerold Schneider

Prof. Dr.-Ing. Ralf Pörtner

Prof. Dr. Michael Morlock

Prof. Dr. Regine Willumeit

Tag der mündlichen Prüfung:

17.12.2013

urn:nbn:de:gbv:830-tubdok-12726

# DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Zeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Materialforschung des Helmholtz-Forschungszentrums Geesthacht (HZG) in Kooperation mit der Technischen Universität Hamburg-Harburg (TUHH).

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Regine Willumeit (HZG) für die Bereitstellung dieses hochinteressanten Forschungsthemas, für die sehr gute Betreuung und die Freiheiten bei der Erstellung meiner Dissertation. Die zahlreichen fachlichen Gespräche haben immer wieder neue Anreize zur Forschungsthematik gegeben und ihr Vertrauen in mein selbständiges Handeln ermöglichte mir die Realisierung vieler neuer Ideen. Ich bedanke mich, dass ich die Ergebnisse meiner Forschungsarbeiten auf mehreren nationalen und internationalen Kongressen, Projekttreffen und Workshops präsentieren durfte. Die fachlichen Gespräche und Diskussionen mit Kooperationspartnern aus Industrie und Forschung und die von ihnen zur Verfügung gestellten Geräte für verschiedenste Versuchsdurchführungen haben maßgeblich zum Erfolg meiner Arbeit und den Publikationen meiner Forschungsergebnisse beigetragen.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Ralf Pörtner (TUHH) für das Interesse an meiner Forschungsarbeit und die sehr gute Betreuung meiner Dissertation danken. Die fachlichen Gespräche, Diskussionen und Anregungen waren außerordentlich hilfreich und zielführend für die Einbindung eines Bioreaktors in meine Untersuchungsmethoden. Hierbei möchte ich auch den Mitarbeitern des Instituts für Bioprocess- und Biosystemtechnik und dabei insbesondere Herrn Dr. Oscar Platas Baradas, Frau Dr. Stephanie Meyer, Frau Dr. Christiane Goepfert und Frau Dr. Katharina Wiegandt für das nette Arbeitsklima und die hilfreichen Diskussionen danken.

Herrn Prof. Dr. Michael Morlock danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und Prof. Dr. Gerold Schneider für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Danken möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Materialforschung des HZG für ihre Unterstützung, eine hervorragende Arbeitsatmosphäre und für anregende Diskussionen. Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Frank Feyerabend, Herrn Martin Wolff und Herrn Dr. Norbert Hort für die außerordentlich gute Unterstützung bei der Herstellung der Prüfmaterialien und Durchführung der biologischen und technischen Prüfungen bedanken. Die fachlichen Gespräche haben mich immer wieder inspiriert, neue Ideen zu entwickeln und in die Arbeit einzubringen. Für das angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung bin ich ganz besonders Herrn Axel Deing, Frau Dr. Anna Schuster, Frau Dr. Birte Mucha, Frau Dr. Agnieszka Rzeszutek, Herrn Dr. Lei Yang, Herrn Dr. Wolfgang Kreuzpaintner,

Herrn Wilhelm Müller, Frau Gabriele Salamon, Herrn Dr. Dieter Lott, Frau Farida Ali, Herrn Dr. Vasył Haramus, Herrn Gerhard Kozik, Herrn Dr. Hajo Dieringa, Herrn Björn Wiese, Frau Rama Nunberg, Herrn Dr. Artem Feoktystov, Frau Nadège Lambert-Benoît, Herrn Ravi Ramchal, Herrn Dr. Torben Fischer, Herrn Dr. Jochen Fenske, Herrn Dr. Jonathan Paul, Herrn Dr. Daniel Höche, Frau Anna Burmester, Frau Daniela Lange, Herrn Dr. Tie Di, Herrn Dr. Fabian Wilde, Frau Dr. Bérengère Luthringer, Frau Elina Valli und Frau Regina Rossmann verbunden.

Für die zur Verfügung gestellten Geräte und die Hilfe bei der Analytik, die sehr gute Arbeitsatmosphäre und die fachlichen Diskussionen danke ich Herrn Dr. Daniel Pröfrock (Institut für Küstenforschung des HZG), Herrn Prof. Dr. Marc Prosenc (Institut für Chemie, Universität Hamburg), Herrn Prof. Dr. Christian Teichert (Montanuniversität Leoben, Österreich), Herrn Michael Schossig (HZG, Außenstelle Teltow, Berlin), Herrn Dr. Malte Ogurrek und Frau Dr. Julia Herzen (HZG, Außenstelle Deutsches Elektronensynchrotron, Hamburg) und Herrn Prof. Dr. Ulrich Bismayer, Frau Dr. Boriána Mihailova und Frau Stephanie Heidrich vom Institut für Mineralogie der Universität Hamburg, sowie Herrn Willi Punessen, Herrn Dr. Daniel Laipple, Frau Petra Fischer, Herrn Bernhard Eltzhig, Herrn Dr. Michael Störmer, Herrn Dr. Thomas Ebel, Herrn Prof. Dr. Ulrich Kainer, Herrn Prof. Dr. Andreas Schreyer und Herrn Dr. Wolfgang Dietzel vom HZG.

Zudem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Frank Witte und Frau Dr. Ivonne Bartsch von der Medizinischen Hochschule Hannover, Frau Prof. Dr. Carla Vogt und Herrn Dr. Heiko Drücker von der Universität Hannover, Herrn Prof. Dr. Diego Mantovani (Université Laval, Kanada), Frau Dr. Andrea Rosanoff (Center for Magnesium Research and Education, Pahoā, USA), Herrn Dr. Mark Staiger (University of Canterbury, Neuseeland), Frau Prof. Dr. Annelie Weinberg (Medizinische Universität Graz, Österreich), Herrn Prof. Dr. C. James Kirkpatrick (Johannes Gutenberg-Universität, Mainz), Herrn Dr. Nicolas Kirkland (Nagasaki University, Japan), Prof. Dr. Wolf-Dieter Müller (Charité, Berlin), Herrn Dr. Klaus Liefheit und Herrn Dr. Gerhard Hildebrand (Institut für Bioprozess- und Analysemesstechnik, Heiligenstadt), Frau Dr. Mervi Puska (Universität Turku, Finnland), Frau Dr. Suvi Haimi (Universität Tampere, Finnland), Frau Prof. Dr. Petra Kluger (Fraunhofer Institut, Stuttgart), Frau Dr. Annika Schmidt und Herrn Dr. Matthias Schnabelrauch (INNOVENT, Jena), Herrn Robert Schavan (Syntellix, Hannover), Herrn Prof. Dr. Johannes Rueger (Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg), Herrn Dr. Christoph Hamers (Nikon), Herrn Claus Zenneck (Medorex, Nörten-Hardenberg) und Herrn Prof. Dr. Andrej Atrens (Queensland University, Australien) für die fachlichen Gespräche und die Inspiration für die Biomaterialforschung.

Nicht zuletzt gilt mein größter Dank meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meinem Mann Pontus und meinen Kindern Henrik und Freja, für die fortwährende Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit.

Im Rahmen meiner Doktorarbeit sind folgende Publikationen entstanden und in diese Arbeit eingearbeitet worden:

**Fischer J**, Prosenec MH, Wolff M, Hort N, Willumeit R, Feyerabend F;  
„Interference of magnesium corrosion with tetrazolium based cytotoxicity assays.”  
Acta Biomaterialia 2010 May;6(5):1813-23

**Fischer J**, Proefrock D, Hort N, Willumeit R, Feyerabend F;  
„Improved cytotoxicity testing of magnesium materials.”  
Materials Science and Engineering Part B 2011 June;176(11):830-834

**Fischer J**, Feyerabend F, Hort N, Kainer KU, Schreyer A, Willumeit R;  
„Cytotoxic and immunological effects of magnesium alloy elements on cells.”  
Proceedings 8th International Conference on Magnesium Alloys and their Applications (Wiley-VCH 2009)

Feyerabend F, **Fischer J**, Holtz J, Witte F, Willumeit R, Drücker H, Vogt C, Hort N;  
„Evaluation of short term effects of rare earth and other elements used in magnesium alloys on primary cells and cell lines.”  
Acta Biomaterialia 2010 May;6(5):1834-42

Willumeit R, **Fischer J**, Feyerabend F, Hort N, Bismayer U, Heidrich S, Mihailova BD;  
„Chemical surface alteration of biodegradable magnesium exposed to corrosion media.”  
Acta Biomaterialia 2011 June;7(6):2704-15

Feyerabend F, Witte F, Vogt C, **Fischer J**, Schreyer A, Kainer KU, Hort N, Willumeit R;  
„*In vitro* testing of magnesium alloys - challenges and options.”  
Proceedings 8th International Conference on Magnesium Alloys and their Applications (Wiley-VCH 2009)

Wolff M, Wiese B, **Fischer J**, Ebel T, Willumeit R;  
„Sintering of porous components from ternary Mg-Y-Ca alloys for orthopaedic applications.”  
Proceedings World Congress and Exhibition “Powder Metallurgy” PM2010



# INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	a
ABSTRACT .....	1
1 EINLEITUNG.....	3
2 STAND DES WISSENS .....	7
2.1 Implantatmaterialien.....	7
2.2 Resorbierbare Implantatmaterialien.....	9
2.3 Magnesium als Implantatmaterial .....	10
2.4 Abbau von Magnesiumimplantaten.....	13
2.5 ISO- und ASTM-Prüfmethoden: Ermittlung der Zytotoxizität <i>in vitro</i> .....	19
2.6 Biochemische Assays für die quantitative Messung der Zytotoxizität .....	20
3 MATERIAL UND METHODEN.....	23
3.1 Zellkultur .....	23
3.2 Analytik zur Bestimmung des pH-Wertes, der Osmolalität und des Magnesiumgehalts .....	26
3.3 Biochemische Assays für die quantitative Messung der Zytotoxizität .....	29
3.3.1 Kalorimetrisches MTT-Assay.....	29
3.3.2 Kalorimetrisches XTT-Assay.....	30
3.3.3 Chemolumineszentes BrdU-Assay .....	30
3.3.4 Vitalfärbung mit Calcein-AM und Ethidium Homodimer-1 .....	31
3.4 Prüfmethoden der ISO und ASTM Normen .....	31
3.4.1 Extrakttest .....	32
3.4.2 Direkter Kontakttest - Variante 1: Material auf Zellen.....	34
3.4.3 Direkter Kontakttest - Variante 2: Zellen auf Material.....	35
3.4.4 Direkter Kontakttest - Variante 3: Zellen auf Material im Bioreaktorsystem .....	36
3.5 Bestimmung der LD50 von Magnesiumsalz .....	40
3.6 Materialherstellung.....	41
3.6.1 Gießmethoden (KG, TG).....	42
3.6.2 Sintermethode (S) .....	43

# INHALTSVERZEICHNIS

---

3.6.3	Probensterilisation .....	44
3.6.4	Korrosions- und Degradationsverhalten der Prüfmaterialien .....	44
3.6.5	Verwendete Prüfmaterialien .....	46
3.7	Statistische Auswertung .....	47
4.	BIOCHEMISCHE ASSAYS FÜR DIE QUANTIFIZIERUNG DER ZYTOTOXIZITÄT VON MAGNESIUMMATERIALIEN.....	49
4.1	Tetrazolium-basierte Assays MTT und XTT .....	49
4.1.1	Einfluss der Kontaktart .....	50
4.1.2	Einfluss von pH-Wert, Osmolalität und Magnesiumkonzentration .....	53
4.2	BrdU.....	55
4.3	Vitalfärbung.....	57
4.4	Diskussion und abschließende Beurteilung der biochemischen Nachweismethoden.....	59
5	EXTRAKTTTESTS NACH ISO-NORM FÜR DIE ERMITTLUNG DER ZYTOTOXIZITÄT VON MAGNESIUMMATERIALIEN <i>IN VITRO</i> (EIGNUNGS- UND PROBLEMANALYSE UND LÖSUNGSMÖGLICHKEITEN).....	65
5.1	Analyse des Magnesiumgehaltes von Reinmagnesiumextrakt .....	66
5.2	Ergebnisse der Zytotoxizitätstests (MTT und Lebend/Tot-Vitalfärbung).....	68
5.3	Ranking der Zytotoxizität der Prüfmaterialien mit Hilfe der ISO-empfohlenen 70%-Viabilitätsgrenze .....	72
5.4	Untersuchung der Zytotoxizität von Magnesium für die verwendeten Zelltypen .....	73
5.4	Farbe der Extrakte.....	75
5.5	Osmolalität der Extrakte .....	77
5.7	Diskussion und abschließende Beurteilung des Extrakttests.....	79
6	DIREKTER KONTAKTTTEST NACH ISO-UND ASTM-NORM FÜR DIE ERMITTLUNG DER ZYTOTOXIZITÄT VON MAGNESIUMMATERIALIEN <i>IN VITRO</i> (EIGNUNGS- UND PROBLEMANALYSE UND LÖSUNGSMÖGLICHKEITEN) .....	83
6.1	Direkter Kontakttest - Variante 1: Material auf Zellen.....	84
6.2	Direkter Kontakttest - Variante 2: Zellen auf Material.....	86

# INHALTSVERZEICHNIS

---

6.3	Direkter Kontakttest - Variante 3: Zellen auf Material im Bioreaktorsystem.....	89
6.4	Diskussion und abschließende Beurteilung des Direkten Kontakttests .....	95
7	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK .....	101
8	LITERATUR.....	105

# INHALTSVERZEICHNIS

---

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\alpha$	Alpha-Niveau (annehmbare Wahrscheinlichkeit eines unrichtigen Schlusses auf eine Wirkung)
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Aluminiumoxid
AM60	Magnesiumlegierung mit 6 Gew.-% Aluminium und <1 Gew.-% Mangan
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>analysis of variance</i> )
as-cast	gegossen
as-extruded	stranggepresst
as-rolled	gewalzt
as-sintered	gesintert
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
AZ31	Magnesiumlegierung mit 3 Gew.-% Aluminium und 1 Gew.-% Zink
AZ91D	Magnesiumlegierung mit 9 Gew.-% Aluminium und 1 Gew.-% Zink (als 4. Variante von AZ91 registriert)
BrdU	Bromdesoxyuridin
Ca	Calcium
Calcein-AM	Calcein Acetoxymethylester
Cl <sup>-</sup>	Chloridion
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cpMg	Reinmagnesium für die Industrie ( <i>commercial pure magnesium</i> )
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
df	Freiheitsgrade ( <i>degrees of freedom</i> )
DK	Direkter Test
DL-PLA	Poly-DL-Laktat
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsuloxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure ( <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
e <sup>-</sup>	Elektron
ECACC	<i>European collection of cell cultures</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Antikörperbasiertes Nachweisverfahren ( <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> )
E-MEM	<i>Eagle's minimum essential medium</i>
E-Modul	Elastizitätsmodul
EthD-1	Ethidium Homodimer-1
Ext	Extrakttest
FDA	Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten von Amerika (Food and Drug Administration)
FG	Fließgeschwindigkeit
FKS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

FRG-1	Forschungsreaktor 1
Gew.-%	Gewichtsprozent
H <sup>+</sup>	Wasserstoffion
H <sub>2</sub>	Wasserstoff
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Kohlensäure
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Hydrogencarbonat
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Hydrogenphosphat
HZG	Helmholtz-Forschungszentrum Geesthacht
ICI	Bestrahlung im Reaktorkern ( <i>In-Core Irradiation</i> )
ICP-MS	Induktiv gekoppeltes Plasma Massenspektrometer ( <i>inductive coupled plasma mass spectrometer</i> )
ISO	Internationale Organisation für Normung ( <i>International Organization for Standardization</i> )
K	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KG	Kokillenguss
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
LAE442	Magnesiumlegierung mit 4 Gew.-% Lithium, 4 Gew.-% Aluminium und 2 Gew.-% Seltene Erden
LD50	Letale Dosis 50%
Mg	Magnesium
MG-63	Humane Osteosarkomzelllinie
Mg2Ag	Magnesiumlegierung mit 2 Gew.-% Silber
Mg6Ag	Magnesiumlegierung mit 6 Gew.-% Silber
Mg0,6Ca	Magnesiumlegierung mit 0,6 Gew.-% Calcium
Mg0,8Ca	Magnesiumlegierung mit 0,8 Gew.-% Calcium
Mg 0,9Ca	Magnesiumlegierung mit 0,9 Gew.-% Calcium
Mg1Ca	Magnesiumlegierung mit 1 Gew.-% Calcium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgCO <sub>3</sub>	Magnesiumcarbonat
Mg10Gd1Nd	Magnesiumlegierung mit 10 Gew.-% Gadolinium und 1 Gew.-% Niob
MgO	Magnesiumoxid
Mg(OH) <sub>2</sub>	Magnesiumhydroxid
Mg4Y	Magnesiumlegierung mit 4 Gew.-% Yttrium
MTT	<i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i>
mZ	mit Zusatzschritt
n	Anzahl
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
n.d.	nicht festgelegt ( <i>not defined</i> )
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
OH <sup>-</sup>	Hydroxidion
Osteobl	Osteoblasten
oZ	ohne Zusatzschritt
p	Signifikanzwert ( <i>probability</i> )
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>Phosphate Buffered Solution</i> )
PEEK	Polyetheretherketon
pH	aus dem Lateinischen: <i>potentia Hydrogenii</i>
PLGA	Polylactid-co-Glycolid ( <i>poly(lactic-co-glycolic acid)</i> )
PP	Polypropylen
PTFE	Polytetrafluorethylen
rlu	relative Lichteinheiten ( <i>relative light units</i> )
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>Ribonucleic acid</i> )
RT	Raumtemperatur
RV	Rotviolett
S	Sintern
SBF	Simulierte Körperflüssigkeit ( <i>Simulated Body Fluids</i> )
SiC	Siliziumkarbid
SD	<i>SensorDish</i>
SDR	<i>SensorDish Reader</i>
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Sulfat
T4	Temperaturbehandlung bei 440°C für 16 h mit Wasserabschreckung
Ti6Al4V	Titan mit 6 Gew.-% Aluminium und 4 Gew.-% Vanadium
Ti6Al7Nb	Titan mit 6 Gew.-% Aluminium und 7 Gew.-% Niob
TG	Tütenguss
TUHH	Technische Universität Hamburg-Harburg
WE43	Magnesium mit 4 Gew.-% Yttrium und 3 Gew.-% Seltene Erden
V2A (Stahl)	Versuchsschmelze 2 Austenit
XTT	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid; 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide
ZrO <sub>2</sub>	Zirkonoxid

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

## ABSTRACT

Magnesium bietet optimale Eigenschaften für die Verwendung als resorbierbares Implantatmaterial für die Anwendung in der Orthopädie, Traumatologie und Pädiatrie. Es hat ähnliche mechanische Eigenschaften wie Knochen, ist ein essentielles Element für den menschlichen Körper und regt die Knochenneubildung an. Um Magnesium als Implantatmaterial auf dem Markt zu etablieren, muss zunächst unter anderem die Zytotoxizität der entwickelten Magnesiummaterialien *in vitro* untersucht werden. Diese Untersuchung wird anhand von standardisierten Prüfverfahren (Normen) durchgeführt, die von der ISO und der ASTM vorgegeben werden. Diese standardisierten Prüfverfahren sind allerdings für die allgemeine Prüfung von Medizintechnikprodukten entwickelt worden und decken damit ein sehr breites Spektrum an Prüfmaterialien ab. Es ist dem jeweiligen Prüfer überlassen, geeignete Prüfmethoden auszuwählen und wenn notwendig zu modifizieren und anzupassen. Die Eignung dieser standardisierten Prüfverfahren für Magnesiummaterialien wurde bisher kaum untersucht. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass die Prüfung von Magnesiummaterialien anhand dieser Normen zu Problemen führen kann. Allerdings wurde diese Problematik bisher kaum untersucht und es gibt nur wenige Lösungsmöglichkeiten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob die standardisierten Prüfmethoden für Magnesiumprüfmaterialien geeignet sind, zu welchen Problemen es bei der Verwendung kommen kann, welche Ursachen hierfür relevant sein können und Lösungsmöglichkeiten dargestellt.

Für die quantitative Messung der Zytotoxizität der Prüfmaterialien werden von der ISO-Norm Tetrazolium-basierte Assays empfohlen. Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten jedoch, dass es durch die hohe reduktive Korrosionsumgebung zu einer Wechselwirkung des freigesetzten Magnesiums mit den enzymatischen Reaktionen, die die biologische Unbedenklichkeit des Materials zeigen sollen, kommen kann, die zu Falsch-Positiv-Ergebnissen führten. Im Rahmen dieser Arbeit konnten Lösungsmöglichkeiten gefunden werden, so dass alle vorgeschriebenen Versuche dennoch anwendbar sind.

Die Untersuchung und Beurteilung der Zytotoxizität von Prüfmaterialien wird anhand der ISO- und ASTM-Normen mit Extrakten der Prüfmaterialien und/oder im direkten Kontakt mit den Prüfmaterialien durchgeführt. Für diese beiden Prüfmethoden (Extrakttest und Direkter Kontakttest) waren die korrosionsbedingte starke Erhöhung der Osmolalität und des pH-Wertes und die Akkumulation von Degradationsprodukten problematisch. Für die Untersuchung mit Extrakten wurden im Rahmen dieser Arbeit Lösungsmöglichkeiten entwickelt, die eine Anwendung des Extrakttests ermöglichen. Der Direkte Kontakttest nach Norm ist nur für Prüfmaterialien geeignet, die langsam degradieren, da der korrosionsbedingte starke Anstieg von Osmolalität und pH-Wert die Adhäsion der Zellen auf den

## ABSTRACT

---

Prüfmaterialien erschwert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig ein Bioreaktor für den Direkten Kontakttest mit Magnesiumprüfmaterialien eingesetzt, um eine dynamische Kultivierung zu ermöglichen und damit die bei der Korrosion von Magnesium entstehenden hohen pH-Werte und Osmolalitäten auf physiologische neutrale Werte zu bringen und zu stabilisieren.

# 1 EINLEITUNG

Für die Behandlung von Knochenbrüchen, Bänderrissen und zur Rekonstruktion von Knochengewebe werden unter anderem permanente Implantatmaterialien verwendet [1]. Entweder verbleiben diese Materialien im Körper des Patienten oder werden mit einer zweiten Operation wieder entfernt [2]. Bei Verbleib im Körper behindern sie bei Kindern das Wachstum [3] und bergen für Patienten allen Alters ein erhöhtes Risiko für eine Fremdkörperreaktion (Entzündungen, Infektionen, Abstoßung, Allergien) [4, 5]. Aber auch die Entfernung der Materialien ist problematisch und kann zu Wundheilungsstörungen, Zerstörung von Knochen-, Binde-, Nerven- oder Muskelgewebe und zu Infektionen führen [2]. Herkömmlich verwendete metallische Implantatmaterialien (Titan, Edelstahl, Kobalt-Chrom-Molybdän, Tantal) sind deutlich steifer und stabiler als Knochengewebe und übernehmen die lasttragende Funktion im Körper [1, 5]. Allerdings wird ein Knochen, der nicht belastet wird, abgebaut [5] - ein Knochen, der im physiologischen Umfang belastet wird, dagegen, wenn notwendig, verstärkt aufgebaut (Das Wolff'sche Gesetz der Knochentransformation [6]). Im Idealfall sollte das Knochengewebe daher für die Zeit der Heilung die notwendige Stützwirkung erhalten und hiernach kontinuierlich wieder in die Stützfunktion miteinbezogen werden. Diese Möglichkeit bieten resorbierbare Implantatmaterialien.

Resorbierbare Magnesiummaterialien verfügen über Eigenschaften, die es potentiell zum idealen Kandidaten für die Anwendung am Knochen in der Orthopädie, Traumatologie und insbesondere Pädiatrie machen [1, 7]. Magnesium hat vergleichbare mechanische Eigenschaften wie Knochen und ist resorbierbar. Durch die Resorption des Implantats erfolgt eine zunehmende mechanische Belastung des Knochengewebes. Beim Abbau des Magnesiums entsteht ein alkalisches Milieu, welches im Tiermodell zu einer Neubildung von Knochenmaterial führte [8-10]. Nicht zuletzt ist Magnesium ein essentielles Element für alle Organismen und muss dem Körper täglich in ausreichenden Mengen zugeführt werden, um Magnesiummangel vorzubeugen. Die erforderliche Tagesdosis beträgt etwa 500 mg [11]. Magnesium ist an mehr als 300 Enzymreaktionen als Enzymbestandteil oder Cofaktor beteiligt [12]. Freie Magnesiumionen beeinflussen das Zellmembranpotential, stabilisieren das Ruhepotential von erregbaren Muskel- und Nervenzellen und fungieren als *second messenger* im Immunsystem.

Um Magnesium als Implantatmaterial einsetzen zu können, müssen, unter anderem, biologische Tests zur Ermittlung der Zytotoxizität des Materials durchgeführt werden. Die biologische Testung von Medizinprodukten wird anhand von standardisierten Prüfverfahren (Normen) durchgeführt. Diese Normen werden z.B. von der Internationalen Organisation für Normung (*International Organization for Standardization* (ISO)), der Amerikanischen Gesellschaft für Tests und Materialien (*American Society for Testing and Materials* (ASTM)), oder der

# EINLEITUNG

---

Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten von Amerika (*Food and Drug Administration* (FDA)) erarbeitet und publiziert. Die Zulassung eines Medizintechnikproduktes wird bei einer „Benannten Stelle“ (*Notified Bodies*) beantragt. „Benannte Stellen“ sind neutrale unabhängige Organisationen, die für die Prüfung und Zulassung akkreditiert sind. Diese prüfen Medizintechnikprodukte anhand der oben genannten Normen. Dadurch bieten diese standardisierten Prüfverfahren die Möglichkeit, international einheitliche vergleichbare Testungen durchzuführen und damit für den Patienten sichere Produkte herzustellen. Um ein Implantatmaterial auf dem Markt zu etablieren, wird zuerst die Toxizität des Prüfmaterials auf Zellen (Zytotoxizität) *in vitro* im Labor untersucht. Wenn geeignete Kandidaten gefunden wurden, wird die Untersuchung des Materials *in vivo* in geeigneten Tiermodellen fortgesetzt. Danach kommen die klinischen Studien am Patienten (Phase 1, Phase 2 und Phase 3), die mehrere Jahre benötigen.

Die Zytotoxizität der Prüfmaterialien wird *in vitro* im Labor nach ISO- und ASTM-Normen mit Extrakten des Prüfmaterials (in der Regel bei abbaubaren Polymeren) und/oder im direkten Kontakt mit dem Material (z.B. bei permanenten Implantatmaterialien) untersucht [13, 14]. Diese Prüfmethoden wurden für die allgemeine Testung von Medizintechnikprodukten und Materialien entwickelt und decken damit eine große Bandbreite ab. Daraus resultiert, dass die Normen nicht einen bestimmten Test für die Zytotoxizitätsprüfung vorschreiben. Stattdessen werden eine Reihe von Mess-Parametern (Zellschädigung, Zellwachstum, metabolische Aktivität, ...) und allgemein mögliche Testsysteme (Tetrazolium-basierte MTT- und XTT-Assay, Neutralrot-Test, Koloniebildung) empfohlen [13]. Hinsichtlich resorbierbarer Materialien wird darauf hingewiesen, dass die Eignung der empfohlenen Untersuchungsmethoden überprüft und wenn nötig eine Anpassung und Veränderung der Standardprüfmethoden durchgeführt werden sollte [13]. Bisher wurden Magnesiummaterialien entweder nach den in den jeweiligen Laboren üblichen Prozeduren oder unter Anwendung der entsprechenden Normen untersucht, ohne jedoch systematisch zu überprüfen, ob es unter Umständen Kreuzreaktionen zwischen dem reaktiven Magnesium und den vorgeschriebenen Tests gibt.

Ziel dieser Arbeit war daher eine umfassende Untersuchung der Standardprüfmethoden für die Anwendung bei abbaubaren Magnesium-Implantatmaterialien. Magnesium ist ein hochreaktives Element. Zudem führt der Abbau der Magnesiummaterialien zu einer Erhöhung der Osmolalität, einem alkalischen Milieu und der Freisetzung von Legierungselementen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht, zu welchen Problemen das beim Abbau der Magnesiumprüfmaterialien entstehende reaktive Milieu führen kann. Im weiteren Verlauf wurden die Ursachen ermittelt, warum die Tests Probleme bereiten. Zudem wurden Lösungsmöglichkeiten erhoben und verifiziert, die eine Beurteilung der Zytotoxizität von Magnesiumprüfmaterialien ermöglichen.

Der Abbau von Magnesiummaterialien *in vitro* in Korrosionslösungen ist bisher nicht vergleichbar mit dem Abbau *in vivo* im Tiermodell [15]. Der Abbau läuft verschieden schnell ab und damit ist es nicht möglich, von Ergebnissen aus technischen *in vitro*-Korrosionsuntersuchungen nach ASTM- oder ISO-Normen auf mögliche *in vivo*-Ergebnisse zu schließen. Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass bei der Korrosion der Magnesiumprüfmaterialien *in vitro* unphysiologisch stark alkalische pH-Werte und hohe Osmolalitäten entstehen können. Dennoch zeigen Ergebnisse aus *in vivo*-Tierstudien, dass Magnesiummaterialien durchaus zu biokompatiblen Ergebnissen führen können und dabei sogar die Knochenneubildung anregen [8]. Im menschlichen Körper werden erhöhte pH-Werte abgepuffert und erhöhte Osmolalitäten durch kontinuierlich fließende Körperflüssigkeiten (Blut, Lymphe, Extrazellularflüssigkeiten) ausgeglichen. Um diese dynamische *in vivo*-Situation besser zu simulieren, wurde daher in dieser Arbeit zusätzlich zu den empfohlenen statischen Prüfmethodeen erstmalig ein Bioreaktorsystem angewendet und hinsichtlich seiner Eignung als Testsystem für resorbierbare Magnesiummaterialien untersucht.



## 2 STAND DES WISSENS

### 2.1 Implantatmaterialien

Implantatmaterialien werden in der Orthopädie und der Unfallchirurgie für die Fixierung von Brüchen, für Rekonstruktionen oder als Gelenkersatz (Arthroplastik) genutzt. Im Bereich der Fixierung und Rekonstruktion handelt es sich im Knochenbereich z.B. um Platten, Drähte, Schrauben, Stifte, Marknägel und Modelliermasse. Gelenkersatz wird für die Arthroplastik von Hüft-, Knie-, Schulter-, Sprung-, Ellenbogen-, Hand- und Fingergelenken benötigt.

Studien der Krankenkassen zeigen den großen Anteil, den Krankheiten und Verletzungen des Muskel- und Skelettsystems an der Verursachung von Fehltagen der Arbeitnehmer, Krankenhausaufenthalten und Arbeitsunfällen haben [16-20]. Die Gesundheitsreporte der BARMER GEK und der DAK Krankenkasse von 2012 zeigten, dass im Jahre 2011 21,3-22,1% der krankheitsbedingten Fehltag in den Bereich des Muskel- und Skelettsystems fielen und 13,4-13,9% durch Verletzungen verursacht wurden. Damit verursachten Erkrankungen des Muskel- und Skelettsystems den größten und Verletzungen den dritt- bis viertgrößten Anteil der Fehltag [16, 18]. Ein Krankenhausaufenthalt kostete im Jahre 2011 bei einer Erkrankung im Muskel- und Skelettsystem im Durchschnitt 83 Euro pro Tag und Patient und verursachte damit die dritthöchsten Kosten [17]. Verletzungen wurden mit durchschnittlich 75,5 Euro angegeben und kamen damit an vierter Stelle im Vergleich mit den anderen Krankheitskategorien [17]. Es besteht daher ein erheblicher Bedarf, die Kosten im muskuloskeletalen Bereich und im Bereich der Verletzungen zu reduzieren. Des Weiteren besteht Bedarf, die Anzahl der Fehltag der Arbeitnehmer zu reduzieren und das Wohl des Patienten durch eine Verbesserung und Verkürzung des Heilungsprozesses zu verbessern.

Resorbierbare Implantatmaterialien bieten die Möglichkeit, die Gesundheitskosten zu senken und das Wohl des Patienten zu erhöhen. Diese Materialien verbleiben für einen bestimmten Zeitraum im Körper und werden dann vom Körper abgebaut und durch neues körpereigenes Gewebe ersetzt. Dadurch entfällt die Notwendigkeit der Entfernung des Implantats. Durch die ersparte zweite Operation entfallen damit auch die mit einem operativen Eingriff verbundenen Risiken für den Patienten. Eine Entfernung von Implantaten setzt den Patienten Begleitrisiken wie Hämatombildung, Nachblutung, Refraktur, unerwartet lange Operationszeiten und Wundheilungsstörungen [21-24] aus. Ein weiteres großes Problem bei permanenten Implantaten entsteht, wenn Nägel, Platten oder Stifte im Rahmen der Frakturbehandlung verbiegen oder brechen. Die Entfernung dieser Implantate ist dann sehr kompliziert [2]. Problematisch ist auch, wenn die Ansatzstelle im Schraubenkopf für den Schraubendreher zerstört ist und damit keine schlüssige Verbindung für die Entfernung mehr gegeben ist [2]. Die vielen verschiedenen Hersteller von Osteosynthesematerialien bieten zudem ihre Implantate häufig

zusammen mit dem passenden Operationsbesteck (z.B. Schraubendreher) an. Dabei entwickeln viele Hersteller eigene Werkzeuge und verkaufen sie als Paket an die medizinischen Institutionen. Leider hat dies den Nachteil, dass ein Implantat nicht korrekt entfernt werden kann, wenn der Hersteller des Implantats nicht bekannt ist oder nicht auf dem Röntgenbild identifiziert werden kann. Wenn der Patient z.B. im Falle eines Sportunfalls im Urlaub für die Entfernung des Implantats nach dem Urlaub eine andere medizinische Einrichtung aufsucht als für die Implantation, ist es möglich, dass das jeweilig passende Werkzeug nicht vorhanden ist [2]. Wenn ein Implantat in diesen Fällen auf andere Weise entfernt werden muss, drohen zusätzliche Gewebsverluste, Schmerzen, Infektionsrisiken und die Behinderung des Heilungsprozesses. Der Einsatz von resorbierbaren Implantatmaterialien ist daher sowohl für den Patienten als auch für das Gesundheitssystem von großem Vorteil [1]. Insbesondere im Bereich der Pädiatrie sind resorbierbare Materialien von Vorteil und werden dringend benötigt [3]. Für Kinder sind permanente Implantate nur bedingt geeignet, da durch deren schnelles Wachstum Implantate mehrmals ersetzt werden müssen oder zumindest eine zweite Operation zur Entfernung eines Implantats notwendig ist. Durch resorbierbare Materialien könnten die Risiken und traumatischen Erfahrungen für Kinder deutlich reduziert werden [25, 26]. In einer Studie von Sanger wurden Ergebnisse von Implantationen von resorbierbaren Materialien (Platten, Schrauben, Stifte, Nägel und Nieten) im Bereich der pädiatrischen Kopfchirurgie analysiert [27]. Die Untersuchung umfasste 52 Kinder mit einem Durchschnittsalter von acht Monaten, die im Zeitraum von 2001-2006 einer Stabilisation der Schädelknochen mit resorbierbaren Implantatmaterialien unterzogen wurden. 80% der Implantationen führten zu exzellenten Ergebnissen. Nur einem Kind musste eine Platte wieder entfernt werden, und selbst in diesem Fall wurde das Endergebnis als gut befunden.

Im muskuloskeletalen Bereich und für die Behandlung von Verletzungen steht eine Vielzahl von Implantatmaterialien zu Verfügung. Für den Ersatz von Hüft- und Kniegelenken müssen die verwendeten Implantatmaterialien über eine ausreichende mechanische Stabilität verfügen. Sie verbleiben nach der Implantation im Körper. Sie werden nur im Falle einer Entzündungsreaktion oder bei Versagen (Lockerung, Bruch) operativ entfernt und ersetzt. Für diesen Anwendungsbereich ist der Markt mit vielen etablierten permanenten Implantatmaterialien gut abgedeckt. Die Palette umfasst hierbei sowohl Metalle, als auch Keramiken und Polymere [28]. Die metallischen Implantate aus Titanlegierungen, Kobalt-Chrom-Molybdän-Legierungen, Edelstahl oder Tantal besitzen eine hohe mechanische Festigkeit und Steifigkeit. Die hohe Korrosionsbeständigkeit und Festigkeit sind der Grund dafür, dass diese Metalle sich so gut in lasttragenden Bereichen etabliert haben [28]. Keramiken, wie beispielsweise Aluminiumoxid ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) und Zirkonoxid ( $\text{ZrO}_2$ ) werden seit 40 Jahren als Gelenkersatz eingesetzt. Ihr Erfolg in diesem Einsatzgebiet ist maßgeblich auf ihrer hohen Verschleißbeständigkeit begründet [28]. Vorteil der Polymere ist die gute Formbarkeit. Sie sind im Bereich von Gelenkverbindungen

etabliert, wo sie zu einer verbesserten Lastverteilung vom Implantat zum Knochen und einer reibarmen lasttragenden Gelenkbewegung führen [28].

Für die Behandlung von Knochenbrüchen, Osteosynthesen, Bänderfixierungen und Knochenrekonstruktionen sind die deutlich höheren mechanischen Kennwerte von Metallen und Keramiken gegenüber Knochen allerdings sehr problematisch [5]. Die ungleich höhere Steifigkeit und Bruchfestigkeit der Implantatmaterialien im Verhältnis zum kortikalen Knochengewebe führt zu einer schlechten Weiterleitung von Druckbelastungen (Belastungsabschirmung; *stress shielding*) und damit zu einem bevorzugten Brechen des Knochens bei großer Belastung. Zudem wird das Knochengewebe mechanisch durch das stabilere Implantatmaterial entlastet und die Knochenzellen damit mechanisch entsprechend weniger belastet. Mechanische Belastung ist allerdings ein Stimulus für aktiven Knochenaufbau (Wolff'sche Gesetz [6]). Fehlt dieser, degeneriert das Knochenmaterial. Auch die Muskeln werden weniger in Anspruch genommen, was wiederum Atrophien (Muskeldegeneration) begünstigt. Der Knochen kann dabei so stark verändert und geschwächt werden, dass er nach dem Entfernen von Platten, Schrauben oder Nägeln erneut bricht, da er die mechanische Belastung nicht tragen kann [5, 29].

## 2.2 Resorbierbare Implantatmaterialien

Bei den resorbierbaren Materialien sind Polymere (z.B. Polylaktidsäure, Polyglykolsäure, Polydioxanon) und Keramiken (z.B. Hydroxyapatit, Tricalciumphosphat, Calcit) etabliert. Resorbierbare keramische Werkstoffe wie Calciumverbindungen und Bioglas [30, 31] werden aufgrund ihrer niedrigen mechanischen Belastbarkeit nur als Füllstoff bei Knochentransplantationen, Beschichtungsmaterial in der Prothetik und zur Therapie von Knochendefekten in Form von Gewebestücken, Granulat oder als injizierbare Paste eingesetzt [4]. Bioglas wird zudem im Tissue Engineering als resorbierbares Trägermaterial verwendet. Zellen werden auf dem Bioglasträger ausgesät. Mit dem entstandenen Konstrukt wird beim Patienten krankes oder defektes Gewebe ersetzt. Diese Konstrukte werden bereits in der klinischen Anwendung zur Reparatur von Gelenkknorpel, Haut und Blutgefäßen genutzt, allerdings benötigt der entstandene Gewebeersatz noch dringende Verbesserungen [31]. Polymere sind als zugelassene Medizinprodukte für viele klinische Anwendungen zu finden [4, 32-36]. Osteosynthesysteme [36, 37], Ankersysteme zur Stabilisierung in der Schulter- und Kreuzbandchirurgie [38] und Trägersysteme für Pharmakotherapie (*Drug Delivery*) sind klinisch etabliert. Bei der Degradation einiger Polymere wie z.B. Polylaktidsäure und Polyglykolsäure entsteht ein saures Milieu. Der pH-Wert wird als Grund für Entzündungsreaktionen und Allergien nach Implantationen diskutiert [4]. Weiterhin fördert ein saurer pH-Wert die Aktivierung von Osteoklasten, den knochenabbauenden Zellen im Knochen [39]. Eine Beimengung von basischen Salzen wie Kalziumkarbonat oder karbonathaltigem Apatit führte zu einer wesentlichen Verbesserung der Biokompatibilität [4, 40]. Problematisch ist aber dennoch, dass Polymere bei Röntgenuntersuchungen nicht

sichtbar sind. Durch zusätzliche Beimengungen von Tetrakalziumphosphat kann die Dichte und damit die Sichtbarkeit erhöht werden. Der Abbau von Tetrakalziumphosphat führt zudem zu einem erhöhten pH-Wert, der sich zusätzlich positiv auf die Biokompatibilität auswirkt [41]. Resorbierbare Osteosynthesematerialien auf Polymerbasis können aufgrund ihrer geringen mechanischen Stabilität allerdings nur für gering belastete Frakturen im Hand- und Fußbereich eingesetzt werden [5, 42, 43]. Für die Behandlung von Frakturen an langen Röhrenknochen sind sie keine Alternative zu den permanenten Materialien [5].

Neben den Polymeren und Keramiken werden die beiden resorbierbaren Metalle Eisen und Magnesium für die Eignung als Implantatmaterial untersucht. Magnesium und Eisenschäume bieten ideale Eigenschaften für die Nutzung als resorbierbares Implantatmaterial, da sie ähnliche mechanische Eigenschaften haben wie kortikaler Knochen [4].

### **2.3 Magnesium als Implantatmaterial**

Magnesium wurde erstmals 1878 als Implantatmaterial beschrieben. Der amerikanische Arzt Edward C. Huse beschrieb in seiner Veröffentlichung die Verwendung von Magnesiumdrahtmaterial für die Gefäßligatur [44]. 1900 wurde die Entwicklung von Magnesium als Implantatmaterial vom Arzt Erwin Payr entscheidend vorangetrieben. Zusammen mit Chlumpski entwickelte er dünnwandige Magnesiumröhrchen für die Anastomose (Verbindung) von Blutgefäßen, Nerven und Darmschlingen [45-47] sowie Magnesiumbleche für die Hämangiom-Behandlung [48]. 1932 operierte Lambotte bei vier Kindern im Alter von 7-10 eine kondyläre Oberarmknochenfraktur und bei einem Erwachsenen eine Schlüsselbeinfraktur mit Nägeln aus Reinmagnesium. Zudem setzte er bei einem Erwachsenen zur Behandlung einer Oberarmknochenfraktur eine Platte aus Reinmagnesium ein. Bei allen verheilte der Bruch komplikationslos und die Gelenkfunktionen waren einwandfrei. Die Magnesiumimplantate lösten sich vollständig auf. Bei der Degradation des Magnesiums wurden Gase frei, die zur Bildung von Gastaschen führten. Allerdings waren die Gasansammlungen nicht schmerzhaft, verschwanden nach einigen Wochen und waren nicht weiter von Bedeutung für diese klinischen Fälle [49, 50]. Die Chirurgen Mc Bride und Verbrugge verwendeten Schrauben und Stifte aus Magnesium mit 4-8 Massenprozent Aluminium für Patienten mit Knochenbrüchen [51-55]. Beide waren fasziniert von den biokompatiblen Eigenschaften von Magnesium. Die Implantate wurden vollständig vom peri-implantären Gewebe resorbiert und die Knochenheilung aktiviert [53-55]. Die Gastaschenbildung im peri-implantären Gewebe wurde auch hier von den Chirurgen nicht als schädlich angesehen. Allerdings wurde Magnesium wahrscheinlich dennoch aufgrund der Gastaschenbildung im muskuloskeletalen Bereich durch Edelstahl (V2A Stahl), welches sich in den 30er Jahren als Implantatmaterial neu etablierte, ersetzt [49, 56]. Erst in den letzten Jahrzehnten wurde Magnesium für die muskuloskeletale Anwendung wieder in Erwägung

gezogen. Abbildung 1 zeigt z.B. einen Prototyp einer resorbierbaren Kreuzbandschraube, der für die Fixierung eines gerissenen Kreuzbandes entwickelt wurde. Die Anwendung von Magnesium war allerdings bisher hauptsächlich auf die Entwicklung von Stents fokussiert. Im Bereich der Pädiatrie wurden erfolgreich bei zwei Neugeborenen ein Stent in die Aorta [57] und die Pulmonalarterie [58] und bei einem 11-jährigen Kind ein Stent in den Gallengang implantiert [59]. 2004 wurden in einer multizentrischen (in mehreren Ländern), nicht-randomisierten Studie Magnesiumstents menschlichen Patienten in eine Stenose der rechten Koronararterien implantiert [59]. Die Ergebnisse dieser klinischen Studie waren vergleichbar mit anderen metallischen Stents [60]. Bis dato gibt es allerdings keine zugelassenen Magnesiumimplantate auf dem Markt.



Abbildung 1: Resorbierbares Metallimplantat aus einer Magnesiumlegierung. Prototyp einer etwa 3 cm langen Kreuzbandschraube.

Magnesium ist das vierthäufigste Kation im menschlichen Körper ( $\text{Ca} > \text{K} > \text{Na} > \text{Mg}$ ) [11]. Die tägliche Aufnahme beträgt etwa 0,5 g/Tag [11], die physiologische Einlagerung ist etwa 0,4 g/kg [61]. 60% des Magnesiums ist in mineralisiertem Zustand in den Knochen eingelagert, 20% im Muskelgewebe, 19% in anderen Weichteilgeweben und 1% ist verteilt in extrazellulären Flüssigkeiten wie dem Plasma [62-65]. Magnesium stabilisiert in der Zelle die Struktur von Proteinen, Nukleinsäuren und Zellmembranen [62] und ist Aktivator bzw. Co-Faktor für mehr als 300 verschiedene Enzymreaktionen im Körper [12].

Magnesiumlegierungen verfügen hinsichtlich des Elastizitätsmoduls (E-Moduls) und der Zug- und Druckfestigkeit über mechanische Kennwerte, die denen des kortikalen Knochens ähnlich sind (Tabelle 1). Die Degradation eines Magnesiumimplantats bietet damit die Möglichkeit, dass die auf den Knochen einwirkenden statischen und dynamischen Kräfte mehr und mehr auf den heilenden Knochen übertragen werden. Diese Belastungen regen die natürlichen Heilungsmechanismen des Körpers an. Tierversuche zeigten eine deutlich bessere Osteointegration von Magnesiummaterialien gegenüber anderen Implantatmaterialien (Polymere, Titan). In einem Rattenmodell wurde die Osteointegration bioabbaubarer Magnesiumstifte (WE43 – Magnesium mit 4 Gewichtsprozent (Gew.-%) Yttrium und 3 Gew.-% Seltene

## STAND DES WISSENS

Erden (Neodym)), bioabbaubarer Polymerstifte (PLGA) und permanenten Titanstifte (Ti6Al7Nb) mit Push- und Pull-Out-Tests nach ein-, drei- und sechsmonatiger Implantation untersucht. In dieser Studie wurden für die Magnesiumstifte deutlich höhere Werte gemessen, was ein Zeichen für eine verbesserte Osteointegration ist [3].

*Tabelle 1: In der Literatur beschriebene mechanische Kennwerte für Biomaterialien im Vergleich zu Knochen (Quellen: <sup>1</sup>[7]; <sup>2</sup>[1]; <sup>3</sup>[3]). Die mit <sup>4</sup> gekennzeichneten Materialien wurden im Rahmen dieser Arbeit im Magnesium-Innovations-Zentrum des Helmholtz-Zentrums Geesthacht hergestellt und die mechanischen Kennwerte gemessen. Farbcode: weiß = entspricht den Eigenschaften von Knochen; grau = entspricht nicht den Eigenschaften von Knochen. Die gezeigten Materialien unterhalb der grauen Markierungslinie basieren auf Magnesium.*

Material	Druckfestigkeit [MPa]	Zugfestigkeit [MPa]	E-Modul [GPa]	Relative Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]
<b>Knochen</b> <sup>1</sup>	<b>164-240</b>	<b>35-283</b>	<b>5-23</b>	<b>1,8-2</b>
<b>Knochen</b> <sup>2</sup>	<b>130-180</b>		<b>3-20</b>	<b>1,8-2,1</b>
Titan (Ti6Al4V) <sup>1</sup>		896-1172	114	4,43
Titanlegierung <sup>2</sup>	758-1117		110-117	4,4-4,5
Kobalt-Chrom-Legierung <sup>2</sup>	450-1000		230	8,3-9,2
Edelstahl 316L <sup>1</sup>		480-620	193	8
Synthetisches Hydroxyapatit <sup>2</sup>	600		73-117	3,1
Bioglas <sup>1</sup>		40-60	35	
Poly-DL-Laktat) (DL-PLA) <sup>1</sup>		29-35	1,9-2,4	
Polylaktid-co-Glycolid (PLGA) <sup>3</sup>			4,6	
Mg mit 0-4 Gew.-% Ca <sup>1</sup>		210-240		
AZ31 <sup>1</sup> (Mg mit 3 Gew.-% Al und 1 Gew.-% Zn)	110-180	255-290		
AM60B-F <sup>1</sup> (Mg mit 6 Gew.-% Al und <1 Gew.-% Mn)	130	225		1,8
Mg 0,6Ca (TG) <sup>4</sup> (Mg mit 0,6 Gew.-% Ca)	248,5 ± 1,2		1,5 ± 0,1	
Mg 0,8Ca (TG) <sup>4</sup>	262,6 ± 1		6,2 ± 0,4	
Mg 0,9Ca (TG) <sup>4</sup>	235,5 ± 7,6		15,4 ± 3	
Mg 1Ca (TG) <sup>4</sup>	283 ± 5		6 ± 0,8	
Mg 0,9Ca (S) <sup>4</sup>	140 ± 15		8,9 ± 3,6	

Das verbesserte Einwachsverhalten von Magnesiumimplantaten im Knochen wurde hierbei der größeren Oberflächenrauigkeit des Materials zugeschrieben [3, 66-69]. Tierversuche mit Meerschweinchen zeigten zudem, dass Magnesiumimplantate einen osteogenen, also knochenbauenden Effekt auf das Implantat umgebende

Knochenmaterial hatten [8]. Magnesiumimplantate führten zu signifikant mehr neugebildetem und mineralisiertem Knochengewebe als das Kontroll-Implantatmaterial (Polylaktidsäure) [8]. In einer weiteren Tierstudie mit Kaninchen wurde das Hauptkorrosionsprodukt der Magnesiumkorrosion ( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ) zu Zylindern gepresst und implantiert. Auch hier kam es zu einer verstärkten Knochenregeneration [70]. Als mögliche Faktoren für die osteogene Wirkung werden die lokal erhöhte Konzentration an Magnesiumionen und das basische Milieu in Verbindung mit dem Korrosionsprodukt  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  als potentielle Grundlage diskutiert [70]. Die osteogene Wirkung von Magnesium könnte daher die Knochenneubildung während des Implantatzerfalls unterstützen und beschleunigen, so dass der Knochen so schnell wie möglich wieder in seine natürlichen Stützfunktionen miteinbezogen werden kann und eine optimale Heilung unterstützt wird. Ziel der Materialentwicklung ist die Einstellung der Degradationsgeschwindigkeit des Magnesiummaterials, so dass ein Gleichgewicht zwischen Materialresorption und Knochenaufbau entsteht [71].

## 2.4 Abbau von Magnesiumimplantaten

Der Abbau von Magnesiummaterialien basiert auf der Korrosion von Magnesium. Korrosion ist die Reaktion eines Werkstoffes mit seiner Umgebung, die zu einer messbaren Veränderung des Werkstoffes und damit Beeinträchtigung der Funktion des Bauteils (Korrosionsschaden) führen kann. Die wohl bekannteste Art der Korrosion ist das Rosten, die Oxidation von Eisen. Um Bauteile aus Eisen oder Stahl zu schützen wird häufig Magnesium aufgrund seines hohen Reduktionspotentials als Opferanode eingesetzt. Dadurch, dass das unedlere Metall Magnesium in der elektrochemischen Spannungsreihe negativer ist als edlere Metalle wie z.B. Eisen, wird Magnesium anstelle des edleren Metalls oxidiert, es korrodiert.

Reines Magnesium, das nur der Luft ausgesetzt ist, bildet eine graue Oxidschicht ( $\text{MgO}$ ) aus, die einen guten Schutz gegen Korrosion bietet [72]. In Kontakt mit Wasser fängt Magnesium an zu korrodieren. Daher führt auch der Kontakt mit Körperflüssigkeiten (Blut, Gewebeflüssigkeit, Lymphe) im menschlichen Körper korrosionsbedingt zu einem Abbau des Materials bis hin zur vollständigen Auflösung. Daher ist Magnesium für die Medizin von großem Interesse für die Verwendung als resorbierbares Implantatmaterial (Shunts, Knochenimplantate).

Das Korrosionsverhalten von Magnesiummaterialien im menschlichen Körper kann allerdings bisher nicht ausreichend vorherbestimmt werden. Zu wenig ist über den Korrosionsprozess von Magnesium im lebenden Organismus bekannt. Zur Untersuchung der Magnesiumkorrosion werden die Magnesiummaterialien zum einen *in vitro* im Labor in technischen Korrosionsuntersuchungen mit oder ohne Zellen in verschiedenen Lösungen untersucht. Zum anderen wird die Korrosion *in vivo* im Tiermodell und im weiteren Verlauf der präklinischen Tests im Menschen analysiert. Allerdings ist der Vergleich von Ergebnissen aus *in vitro*-Degradations-

## STAND DES WISSENS

---

bzw. Korrosionsuntersuchungen mit *in vivo*-Ergebnissen aus Tierversuchen bisher äußerst problematisch. Studien von Li und Witte zeigen, dass die Korrosion von Magnesium *in vivo* im Tiermodell deutlich langsamer abläuft als bei technischen *in vitro*-Korrosionsuntersuchungen [15, 73]. Die Ergebnisse der Vergleichsstudie von Witte et al sind in Tabelle 2 dargestellt. Dabei zeigten die Magnesiumprüfmaterialien in der *in vitro*-Kontrolle in einer Salzlösung eine vier Größenordnungen höhere Korrosionsgeschwindigkeit als *in vivo* im Meerschweinchen [15]. Zusätzlich zeigt die Studie von Witte auch noch ein entgegengesetztes *in vitro*-Korrosionsverhalten im Vergleich mit der *in vivo*-Untersuchung. Im durchgeführten Tierversuch degradierte die eine Magnesiumlegierung (AZ91D) in der *in vitro*-Kontrolle schneller als im *in vivo*-Tiermodell, während die andere Magnesiumlegierung (LAE442) schneller im *in vivo*-Tiermodell resorbiert wurde als in der *in vitro*-Kontrolle [15] (Tabelle 2).

Tabelle 2: Korrosionsgeschwindigkeit verschiedener Magnesiummaterialien *in vitro* in physiologischer Salzlösung und *in vivo* im Meerschweinchen.

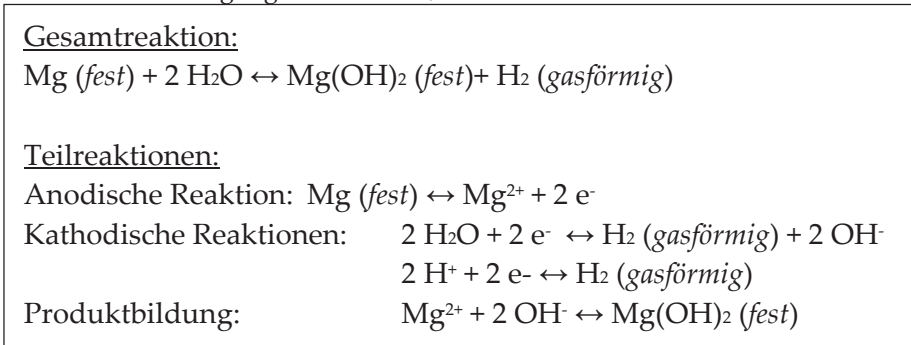
	Korrosionsrate [mm/Jahr]	
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
AZ91D ( <i>as-cast</i> )	2,8	0,0003516
LAE442 ( <i>as-cast</i> )	6,9	0,0001205

Bei den nach ISO- und ASTM-Normen durchgeführten *in vitro*-Korrosionsprüfungen werden einfach zusammengesetzte Salzlösungen verwendet (z.B. NaCl, *Phosphate-buffered saline* (PBS), *Hank's balanced salt solution* (HBSS), *simulated body fluids* (SBF)) (Tabelle 3). Diverse Korrosionsuntersuchungen aus der Literatur zeigen, dass die Korrosionsgeschwindigkeit abhängig vom pH-Wert der Korrosionslösung ist [74]. Je höher der pH-Wert ist, desto langsamer ist die Korrosionsgeschwindigkeit. Bei einem pH-Wert von 8,5- 11,5 wird eine mehr oder weniger schützende Korrosionsschicht aus den Korrosionsprodukten Magnesiumoxid und Magnesiumhydroxid [75, 76] gebildet.

Bei  $\text{pH} > 11,5$  bildet das Korrosionsprodukt Magnesiumhydroxid auf der Oberfläche der Magnesiumprobe sogar eine passivierende Schutzschicht (Formel 1) [1, 76, 78-80]. Diese auf dem Magnesiummaterial gebildete Korrosionsschicht enthält bei einfach zusammengesetzten Korrosionslösungen (NaCl, PBS, HBSS, SBF) nur Calcium, Phosphor, Magnesium und Sauerstoff [10]. Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Schicht nicht nur eine Schutzschicht darstellt, die den weiteren Korrosionsprozess deutlich verlangsamt, sondern zudem auch knochenaufbauend wirkt [9, 10].

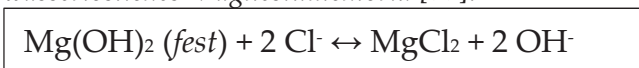
Ein weiterer entscheidender Faktor für die Korrosionsgeschwindigkeit ist die Chloridionen-Konzentration in der Korrosionslösung. *In vitro*-Korrosionsuntersuchungen mit Natriumchlorid-Lösungen, SBF oder physiologischen Salzlösungen wie HBSS oder PBS haben gezeigt, dass eine erhöhte Chloridionen-Konzentration die Korrosion von Magnesium beschleunigt [74, 75].

Formel 1: Reaktionsgleichung von Magnesium in Verbindung mit Wasser. Die Teilreaktionen zeigen den Korrosionsvorgang im Detail [7, 77].



Grund hierfür ist, dass die bei hohen alkalischen pH-Werten gebildete Korrosionsschutzschicht durch Chloridionen wieder in Lösung gebracht werden kann. Wenn die Chloridionenkonzentration über 30 mmol/L steigt, reagieren die Chloridionen mit dem wenig wasserlöslichen Magnesiumhydroxid und bilden wasserlösliches Magnesiumchlorid (Formel 2) [7, 81]. Dadurch wird die Korrosionsaktivität erhöht und weiteres Wasserstoffgas freigesetzt.

Formel 2: Chloridionen reagieren mit dem wenig wasserlöslichen Magnesiumhydroxid und bilden wasserlösliches Magnesiumchlorid [77].



Die Chloridionenkonzentration im menschlichen Plasma beträgt etwa 150 mmol/L und stellt damit einen Aktivator für eine verstärkte Korrosion von Magnesium dar [81]. Und auch *in vitro* eingesetzte physiologische Lösungen wie z.B. Zellkulturmedien (*Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM), *Eagle's Minimum Essential Medium* (E-MEM)), HBSS oder SBF weisen Chloridionen-Konzentrationen deutlich über 30 mmol/L auf [82-84] (Tabelle 3).

Bisher ist es nur schwer möglich, von Ergebnissen aus technischen *in vitro*-Korrosionsuntersuchungen nach ISO- und ASTM-Normen zuverlässig auf das mögliche *in vivo*-Korrosionsverhalten im Tier und gar Menschen zu schließen. Der Korrosionsprozess von Magnesium *in vivo* im Tier oder Menschen ist wesentlich komplexer als in den technischen *in vitro*-Untersuchungen mit einfach zusammengesetzten Korrosionslösungen (z.B. NaCl, *Phosphate-buffered saline* (PBS), *Hank's balanced salt solution* (HBSS), *simulated body fluids* (SBF)). Das chemische Milieu, welches das Magnesiumimplantat im Körper umgibt, ist deutlich umfangreicher und enthält eine komplexe Mischung aus anorganischen und organischen Molekülen. Die Verwendung von Zellkulturmedien wie DMEM oder E-MEM ist der *in vivo*-Situation daher bereits deutlich näher als die Verwendung der einfach zusammengesetzten Salzlösungen. Zellkulturmedien enthalten neben anorganischen Salzen zusätzlich Zucker, Aminosäuren und Vitamine.

## STAND DES WISSENS

Tabelle 3: Zusammensetzung verschiedener Korrosionslösungen. PBS = Phosphat-gepufferte Salzlösung, HBSS = Hank's Balanced Salt Solution, cSBF = corrected Simulated Body Fluid, E-MEM = Eagle's Minimum Essential Medium, DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium, FKS = Fetales Kälberserum. Ein „-“, bedeutet, dass der jeweilige Bestandteil nicht enthalten ist, und „n.d.“, dass die genaue Konzentration nicht bekannt ist. <sup>1</sup> [84]; <sup>2</sup> [85]; <sup>3</sup> [86]; <sup>4</sup> [83]

	Plasma <sup>1</sup>	0,125 M NaCl <sup>1</sup>	PBS <sup>2</sup>	HBSS <sup>2</sup>	c SBF <sup>3</sup>	E-MEM <sup>1</sup>	E-MEM + FKS <sup>1</sup>	DMEM <sup>2,4</sup>	DMEM + FKS <sup>2,4</sup>
Na <sup>+</sup> [mmol/L]	142	125	157	142	142	151	151	127,3	127,3
K <sup>+</sup> [mmol/L]	5	-	4,1	5,9	5,0	5,37	5,37	5,3	5,3
Ca <sup>2+</sup> [mmol/L]	2,5	-	-	1,3	2,5	1,8	1,8	1,8	1,8
Mg <sup>2+</sup> [mmol/L]	1,5	-	-	0,8	1,5	0,811	0,811	0,8	0,8
Cl <sup>-</sup> [mmol/L]	103	125	140	145	147,8	125	125	90,8	90,8
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [mmol/L]	27	-	-	4,2	4,2	26,2	26,2	44,1	44,1
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> [mmol/L]	1	-	11,5	0,8	1	0,897	0,897	0,9	0,9
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> [mmol/L]	0,5	-	-	0,8	0,5	0,811	0,811	0,8	0,8
Aminosäuren [g/L]	n.d.	-	-	-	-	0,86	0,86	1,6	1,6
Zucker [g/L]	n.d.	-	-	1	-	1	1,13	4,5	4,5
Proteine [g/L]	63-80	-	-	-	-	-	4,3	-	3-4,5

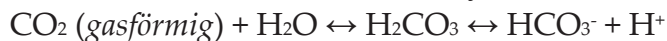
Aminosäuren können mit metallischen Kationen wie dem Mg<sup>2+</sup> Komplexe bilden und so, diese Ionen binden und in Lösung halten [84]. Hinweise hierfür gibt eine Studie von Yamamoto et al, in der Zellkulturmedien zu einer deutlich dünneren Korrosionsschicht auf dem Magnesiummaterial und einer niedrigeren Freisetzung von Magnesiumionen führte, als es bei der Verwendung von Salzlösungen der Fall war [84]. Bei der Einbringung eines Implantats in den menschlichen Körper ist die Anlagerung von Proteinen an das fremde Material eine der ersten Reaktionen des Körpers. Um den Proteingehalt in den Korrosionsmedien zu erhöhen, wird dieses Serum zugesetzt, welches eine Proteinmischung aus Albumin und verschiedenen Globulinen enthält. Ergebnisse aus *in vitro*-Korrosionsuntersuchungen zeigen, dass Proteine einen entscheidenden Einfluss auf das Korrosionsverhalten von Magnesium haben. Der beschleunigende Effekt, den Chloridionen auf die Korrosionsgeschwindigkeit von Magnesium haben, wird durch Proteine umgekehrt und die Korrosionsgeschwindigkeit deutlich verringert [87]. Die Korrosionsgeschwindigkeit von verschiedenen Magnesiumlegierungen in verschiedenen Lösungen wird deutlich verlangsamt [88, 89], in einigen Fällen sogar um einen Faktor von 100 [84]. In der Literatur wird dieser Effekt der natürlichen Proteinabsorption auf der Magnesiumoberfläche zugeschrieben, die zu einer Korrosionsschutzschicht führt. Bei pH 7 und höher sind Proteine negativ geladen, so dass elektrostatische Interaktionen eine vermehrte Bindung von Mg<sup>2+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Ionen an Proteine begünstigen [89-91]. Eine Studie von Willumeit et al. zeigte

dagegen, dass Proteine einen Einfluss auf die Struktur und chemische Zusammensetzung der Korrosionsschicht hatten [92]. Magnesiummaterialien, die in proteinhaltigen Medien inkubiert wurden, waren im Vergleich zu Proben in proteinfreien Medien leichter und wiesen trotzdem gleich dicke Korrosionsschichten auf. Demnach entsteht eine Korrosionsschicht mit deutlich geringerer Dichte, die von Magnesiumionen und vielleicht sogar Wasser durchdrungen werden kann [92].

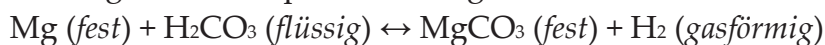
Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor für die Korrosion und die Bildung der Korrosionsschicht ist die Anwesenheit von CO<sub>2</sub>. Im menschlichen Körper ist CO<sub>2</sub> durch das Kohlensäure-Bikarbonat-Puffersystem an der Aufrechterhaltung des Blut-pH-Wertes beteiligt (Formel 3). Bei der Verwendung von Zellkulturmedien wird auch dieses Bicarbonat-Puffersystem genutzt um den pH-Wert auf einen physiologischen pH-Wert zu puffern. Dabei muss dem System eine erhöhte Konzentration von CO<sub>2</sub> in der Atmosphäre zur Verfügung gestellt werden. Eine übliche in der Zellkultur verwendete Konzentration beträgt 5% CO<sub>2</sub>. Die Verwendung von 5% CO<sub>2</sub> in der Atmosphäre des Inkubators bewirkt allerdings nicht nur eine optimierte Pufferwirkung zur Stabilisierung des pH-Wertes, sondern führt zudem auch zu einer Veränderung des Korrosionsverhaltens von Magnesium. In Anwesenheit von 5% CO<sub>2</sub>, steigt die im Medium gelöste Menge an CO<sub>2</sub> und es entsteht ein weiteres Korrosionsprodukt, und zwar MgCO<sub>3</sub> (Formel 3) [92].

Formel 3: Magnesium bildet mit Bicarbonat (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) das Korrosionsprodukt MgCO<sub>3</sub> [92].

Kohlensäure-Bikarbonat-Puffersystem:



Bildung des Abbauproduktes MgCO<sub>3</sub>:



Die Korrosionslösungen DMEM und HBSS enthalten zudem noch Natriumbikarbonat, welches in Anwesenheit von CO<sub>2</sub> die Bildung von MgCO<sub>3</sub> noch zusätzlich fördert. Allerdings ist MgCO<sub>3</sub> 20x löslicher als Mg(OH)<sub>2</sub>, so dass MgCO<sub>3</sub> erst in die Korrosionsschicht integriert wird, wenn die Korrosionslösung gesättigt ist [92]. Die Integration von MgCO<sub>3</sub> in die Korrosionsschicht konnte mit Hilfe von XPS Messungen erfolgreich nachgewiesen werden [93].

Studien von Di (unpublizierte Daten) und Willumeit et al. [94] haben gezeigt, welchen großen Einfluss die Umgebungs- und Verarbeitungsparameter (CO<sub>2</sub>-Gehalt und Temperatur der Atmosphäre, Proteine in der Korrosionslösung, Temperaturbehandlung des Prüfmaterials) auf die Korrosionsgeschwindigkeit von Magnesiummaterialien haben (Abbildung 2) [94].

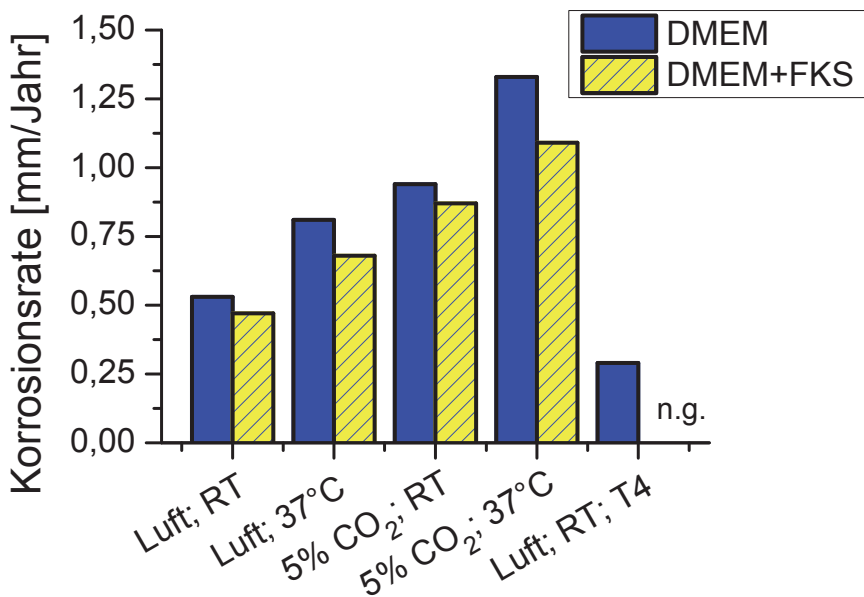
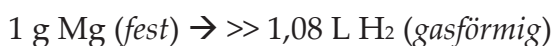


Abbildung 2: Korrosionsgeschwindigkeit von Reinmagnesium in zwei verschiedenen Elektrolytlösungen (DMEM, DMEM+FKS,) ermittelt durch elektrochemische Analyse in einem Mini Cell System-Setup [95]. Die Prüfmaterialien wurden bei verschiedenen Temperaturen (Raumtemperatur (RT) und 37°C) und CO<sub>2</sub>-Gehalten (5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre, Luft mit 0,04% CO<sub>2</sub>) untersucht [194], Tie Di, Helmholtz-Zentrum Geesthacht, nicht publizierte Daten). T4 steht für eine Weiterbehandlung des Prüfmaterials durch eine Temperaturbehandlung bei 440°C für 16 h mit Wasser-Abschreckung (Tie Di, Helmholtz-Zentrum Geesthacht, nicht publizierte Daten).

Die Zugabe von Proteinen in Form von fetalem Kälberserum (FKS) zur Elektrolytlösung führte bei allen Proben zu einer langsameren Korrosionsgeschwindigkeit als bei der Verwendung von reinem Zellkulturmedium. Auch die Weiterverarbeitung des Magnesiumprüfmaterials durch eine Temperaturbehandlung (T4) führte zu einer Reduktion der Korrosionsgeschwindigkeit. Die Inkubation des Prüfmaterials bei 37°C führte dagegen zu einem Anstieg der Korrosionsgeschwindigkeit im Vergleich zu Messungen bei Raumtemperatur (RT). Eine Inkubation des Prüfmaterials in einer Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> statt an Luft führte zu einer weiteren Beschleunigung der Korrosionsgeschwindigkeit.

Bei vollständiger Degradation führt die Korrosion von 1 g Magnesium zur Bildung von über einem Liter Wasserstoffgas (Formel 4). Ist die Korrosionsgeschwindigkeit stark erhöht, besteht die Gefahr, dass der menschliche Körper das entstehende Wasserstoffgas nicht genügend abtransportieren kann und Gastaschen entstehen.

Formel 4: Korrosion von Magnesium führt zur Bildung von Wasserstoff [8].



Witte et al. zeigte im Tiermodell, dass es bei der Implantation von Magnesiumimplantaten in den Knochen von Meerschweinchen zu radiologisch detektierbaren subkutanen Gastaschen kam [8]. Diese Gastaschen erschienen innerhalb einer Woche und verschwanden nach 2-3 Wochen. Die Gastaschen hatten

für die Meerschweinchen allerdings keine beeinträchtigenden Effekte. Auch bei der Anwendung von Magnesiummaterialien im Menschen kam es zur Bildung solcher Gastaschen. Diese führten allerdings auch hier weder zu Schmerzen noch zu anderweitigen Problemen [49]. Das vollständige Auflösen des Magnesiums wurde als ausgesprochen positiv beschrieben [50-52].

## **2.5 ISO- und ASTM-Prüfmethoden: Ermittlung der Zytotoxizität *in vitro***

Medizinprodukte, unter die auch abbaubare Magnesiumimplantate fallen, müssen nach dem Medizinproduktegesetz zahlreichen Prüfungen unterzogen werden, bevor sie für den Markt zugelassen werden. Dies gewährleistet die notwendige Sicherheit für die Behandlungen von Patienten. Diese Prüfungen erfolgen nach standardisierten Methoden, die von der Internationalen Organisation für Normung (ISO) oder der Amerikanischen Gesellschaft für Tests und Materialien (ASTM) festgelegt werden. Medizinprodukte und Materialien, die am oder im menschlichen Körper angewendet werden sollen, müssen laut ISO 10993-1 [96] hinsichtlich ihrer Zytotoxizität getestet werden. Die Prüfung erfolgt nach ISO 10993-5 mit Extrakten (Extrakttest) des zu testenden Materials und/oder im direkten Kontakt (Direkter Kontakttest) mit dem Prüfmaterial [13].

Beim Extrakttest nach ISO 10993-5 erfolgt die Probenvorbereitung nach Vorgaben der ISO 10993-12 [97]. Dabei wird das Prüfmaterial im Lösungsmittel in einem bestimmten Masse- bzw. Oberfläche-zu-Flüssigkeits-Verhältnis unter bestimmten Extraktbedingungen inkubiert. Bei der Verwendung von serumhaltigen Zellkulturmedium als Lösungsmittel darf nur die Extraktbedingung „(37±1)°C für mindestens (24±2) h“ gewählt werden. Das entstandene Extrakt wird unverdünnt und verdünnt auf einen subkonfluenten Zellrasen (80% Konfluenz) gegeben und für mindestens 24 h bei (37±1)°C inkubiert. Je nachdem, welches Puffersystem für das verwendete Zellkulturmedium genutzt wird, werden die Zellen mit oder ohne 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zytotoxizität der Extrakte wird quantitativ mit geeigneten biochemischen Assays ermittelt (siehe Kapitel 2.6).

Beim Direktem Kontakttest nach ISO 10993-5 und ASTM 813-07 wird das Prüfmaterial auf einen subkonfluenten Zellrasen gelegt und unter den gleichen Bedingungen wie beim Extrakttest inkubiert, also bei (37±1)°C für mindestens (24±2) h. Die Materialprobe sollte etwa 10% der Fläche des Zellrasens bedecken. Die Zellkulturplatte sollte so wenig wie möglich bewegt werden, um ein physikalisches Trauma und damit eine Ablösung oder Verschiebung von Teilen des Zellrasens zu vermeiden. Wenn notwendig, können die Zellen laut ISO 10993-5 auch auf dem Material ausgesät werden. Die Zytotoxizität der Prüfmaterialien wird, wie beim Extrakttest, quantitativ mit geeigneten biochemischen Assays ermittelt (siehe Kapitel 2.6).

Die Norm ISO 10993-5 [13] empfiehlt die Nutzung von Zelllinien von anerkannten Bezugsquellen. Empfohlene Zelllinien sind z.B. American Type Culture Collection CCL 1 (NCTC clone 929), CCL 163 (Balb/3T3 clone A31), CCL 171 (MRC-5), CCL 75 (Wi-38), CCL 81 (Vero), CCL 10 (BHK21(C-13)) und V79 379A. Die Nutzung von Zelllinien hat den Vorteil, dass Versuchsergebnisse verschiedenster Institutionen und Forschergruppen besser miteinander verglichen werden können. Zelllinien haben eine lange Lebensdauer und können somit für viele Tests verwendet werden. Die individuellen Zelllinien stammen jeweils von nur einem Spender ab und können bei einer Zellbank erworben werden.

## 2.6 Biochemische Assays für die quantitative Messung der Zytotoxizität

Für die Messung der Zytotoxizität wird von den ISO-Normen keine bestimmte Methode vorgeschrieben, da diese Normen für die Testung einer großen Bandbreite an Medizintechnikprodukten und Materialien entwickelt wurden. Die ISO-Norm empfiehlt bestimmte Messmethoden und Messparameter. Dabei wird die Wahl von geeigneten Messmethoden dem jeweiligen Prüfer überlassen, damit das jeweilige Produkt mit den bestmöglichen und geeignetsten Methoden getestet werden kann. Die Zytotoxizität kann mit qualitativen und quantitativen Messmethoden erfasst werden. Die ISO Norm empfiehlt quantitative Methoden gegenüber qualitativen zu bevorzugen. Qualitative Methoden seien allerdings durchaus für ein Screening geeignet [13]. Mögliche Messparameter der Zytotoxizität werden von der Norm in vier Bereiche aufgeteilt: Analyse der Zellschädigung anhand zellmorphologischer Veränderungen, Messung der Zellschädigung, Messung des Zellwachstums und Messung spezifischer Faktoren des zellulären Metabolismus. Dabei können die Anzahl Zellen, Freisetzung von Enzymen, die Proteinmenge, Freisetzung von Vitalfarbstoffen, Reduktion von Vitalfarbstoffen oder andere messbare Parameter quantifiziert werden [13]. Des Weiteren wird in der Norm darauf hingewiesen, dass Prüfsysteme sorgfältig ausgewählt werden sollten, um zu vermeiden, dass vom Prüfmaterial abgegebene Substanzen das Prüfsystem oder die Messungen stören [13].

Für die quantitative Ermittlung der Zytotoxizität gibt es eine Vielzahl verschiedener Testsysteme. Die ISO Norm 10993-5 empfiehlt die Verwendung der beiden Tetrazolium-basierten Zytotoxizitätsassays MTT und XTT [13]. Diese Assays werden im Allgemeinen häufig für die Materialtestung verwendet, da sie schnell, nicht radioaktiv, einfach und günstig sind [98].

MTT und XTT sind wasserlösliche membrangängige gelbe Farbstoffe, die durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen metabolisiert werden, was zur Bildung von wasserunlöslichen dunkelblauen (MTT) [98] oder wasserlöslichen orangenen (XTT) [99] Formazankristallen führt. Diese Kristalle sind daraufhin nicht

mehr membrangängig und akkumulieren in proliferierenden, unbeschädigten Zellen. Nach der Lyse der Zellen und Solubilisierung der Formazankristalle (nur im Fall von MTT) kann der jeweilige Farbstoff anschließend durch eine kalorimetrische Messung im Multiwell-Spektrophotometer (ELISA-Reader) durch die Ermittlung der optischen Dichte quantifiziert werden. Die Bildung der dunkelblauen bzw. orangenen Formazankristalle ist dabei direkt proportional zu der Anzahl an proliferierenden Zellen [98, 100].



## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Zellkultur

Von der ISO-Norm wird für die Prüfung der Zytotoxizität die Verwendung von folgenden Zelllinien empfohlen: CCL 1 - NCTC clone 929 (Fibroblasten aus der Maus), CCL 163 - balb 3T3 clone A31 (Fibroblasten aus Mausembryonen), CCL 171 - MRC-5 (Fibroblasten aus einer menschlichen Lunge), CCL 75 - WI-38 (Fibroblasten aus einer menschlichen Lunge), CCL81 – Vero (Epithelzellen aus der Niere einer äthiopischen Grünmeerkatze), CCL 10 – BHK-21[C13] (Fibroblasten aus der Niere eines Syrischen Goldhamsters) und V79-379A (Fibroblasten aus der Lunge eines Chinesischen Zwerghamsters). Allerdings sind diese bis auf eine Zelllinie alle tierischen Ursprungs. Und die einzige Zelllinie humanen Ursprungs entstammt der Lunge. Das Zielorgan für die in dieser Arbeit zu untersuchenden Prüfmaterialien war das menschliche Knochengewebe, welches im direkten Kontakt mit den Magnesiumimplantaten sein würde. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit anstelle der empfohlenen Zelllinien die humane Osteosarkomazelllinie (Knochenkrebszellen) MG-63 (CRL 1427) von der ECACC (*European Collection of Cell Cultures*) Zellbank verwendet. Im Laufe dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass primär vom Patienten isolierte Osteoblasten deutlich höhere Konzentrationen Magnesium tolerierten als die Zelllinie. Daher wurden zusätzlich zu den MG-63-Zellen primär isolierte Knochenzellen (Osteoblasten) von drei verschiedenen humanen Spendern verwendet, um die Zytotoxizität der Magnesiumprüfmaterialien auf humane gesunde Knochenzellen genauer zu untersuchen. Der Vorteil solcher Primärzellen ist, dass sie die Variationen der verschiedenen zukünftigen Patienten widerspiegeln und somit unterschiedliche Reaktionen auf Materialien aufzeigen.

### Kultivierung der Zellen

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden steril unter einer sterilen Werkbank (HERAsave, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) mit sterilen Materialien und Lösungen durchgeführt. Für alle Arbeiten wurde doppelt destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O, Millipore, Milli-Q Biocel, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Kultivierung der Zellen fand in einem Inkubator (Heraeus CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> Heracell 150i incubator, Heraeus instruments, Hanau, Deutschland) bei 37°C, 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit statt. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden diese Kultivierungsbedingungen „Zellkulturbedingungen“ genannt. 5% CO<sub>2</sub> in der Begasungsluft wurden aufgrund des eingesetzten Carbonatpuffers in den Medien gewählt. Durch das Carbonat-Puffersystem wurde der pH-Wert der Medien in einen für die eingesetzten Zellen physiologischen Bereich gepuffert. Der pH-Wert des Zellkulturmediums ist abhängig vom NaHCO<sub>3</sub>-Gehalt des Mediums und der CO<sub>2</sub>-Konzentration im Inkubator. DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*) hat einen NaHCO<sub>3</sub>-Gehalt von 3,7g/L. Bei einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5 % wird das DMEM-

# MATERIAL UND METHODEN

---

Medium im Inkubator nach Lindl et al auf einen pH-Wert von 7,6 gepuffert [101]. Für den Fall, dass ein niedrigerer pH-Wert benötigt wird, muss die CO<sub>2</sub>-Konzentration im Inkubator erhöht werden. Das menschliche Blut verfügt über einen physiologischen pH-Wert von etwa 7,4. Eine Messung des pH-Wertes des Zellkulturmediums nach Inkubation im Inkubator ergab einen Wert von 7,35. Daher wurde angenommen, dass die tatsächliche CO<sub>2</sub>-Konzentration im Inkubator höher war als eingestellt und der CO<sub>2</sub>-Wert bei 5% belassen.

## Zellkulturmedium

Als Medium wurde das gebrauchsfertige *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) Glutamax-I (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Standardmäßig wurden dem Medium 10% fetales Kälberserum (FKS, PAA Laboratories, Linz, Österreich) zugesetzt.

## Zellen

### Osteosarkomazelllinie MG-63

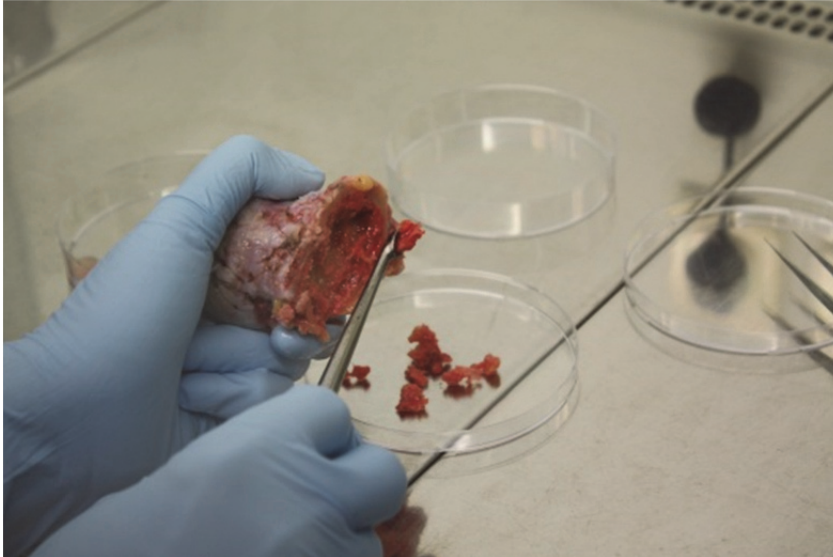
Die humane Osteosarkomazelllinie MG-63 wurde bei der *European collection of cell cultures* (ECACC (Cat.No86051601), Salisbury, Großbritannien) gekauft. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium unter Zellkulturbedingungen inkubiert und das Medium alle 2-3 Tage erneuert. Die Zellen wurden bei 80% Konfluenz passagiert. Für die Experimente wurden Zellen der zweiten Passage nach dem Auftauen verwendet.

### Gewinnung von primär isolierten humanen Osteoblasten

Die Isolation der Osteoblasten wurde nach einem Protokoll von Gallagher durchgeführt [102]. Für die Isolation wurden Hüftköpfe von Patienten verwendet, die bei Hüftoperationen mit vollständigem Ersatz des Hüftgelenks anfielen. Im Rahmen dieser Operation wurde der Hüftkopf des Patienten entfernt. Diese wurden mit dem Einverständnis der Patienten der Forschung zur Verfügung gestellt. Das verwendete Isolationsprotokoll wurde von der lokalen Ethikkommission akzeptiert.

Die Spongiosa des Knochens wurde mit Hilfe eines Knochenlöffels aus dem Hüftkopf gewonnen (Abbildung 3). Die Knochenstücke waren etwa 5 mm im Durchmesser. Durch mehrmaliges Waschen wurden Knochenmark und Nichtknochenbestandteile entfernt. Zum Waschen wurde die Knochenstücke in eine Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS; 8,0 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 0,24 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,78 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2 H<sub>2</sub>O; in ddH<sub>2</sub>O gelöst; eingestellt auf pH 7,4; alle Pulver von Merck, Darmstadt, Deutschland) gegeben und für 30 Sekunden mit einem Vortex (Vortex Genie 2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gemischt. Daraufhin wurde das PBS abgesaugt und durch frisches PBS ersetzt. Dieser Waschprozess wurde so oft durchgeführt bis die Knochenstücke weiß waren. Die Knochenstücke wurden dann

in Zellkulturmedium mit 1% Penicillin/Streptomycin (LifeTechnologies, Darmstadt, Deutschland) für 10 Tage kultiviert ohne das Medium zu erneuern. Danach wurde antibiotikafreies Zellkulturmedium für die Kultivierung der Osteoblasten genutzt und alle 2-3 Tage erneuert. Bei 70-80% Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Für Experimente wurden Zellen der zweiten oder dritten Passage nach der Isolation der Zellen verwendet.



*Abbildung 3: Für die Isolierung von Osteoblasten wurde die Spongiosa mit einem Knochenlöffel aus menschlichen Hüftknochen gewonnen.*

### **Passagieren**

Bei Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mithilfe von 0,05% Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) (LifeTechnologies, Darmstadt, Deutschland) vom Boden der Zellkulturflasche (Cellstar, Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland) gelöst. Das Enzym wurde mit Zellkulturmedium inaktiviert und die Zellen bei  $250 \times g$  zentrifugiert (Labofuge 400R, Heraeus instruments, Hanau, Deutschland). Das Pellet wurde in Zellkulturmedium resuspendiert und auf die neue zu besiedelnde Fläche gegeben.

### **Kryokonservierung und Auftauen**

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst in PBS gewaschen und mit Hilfe von 0,05% Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche (Cellstar, Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland) gelöst. Das Enzym Trypsin wurde mit Zellkulturmedium inaktiviert und die Zellen bei  $250 \times g$  zentrifugiert. Die Zellen wurden in Einfriermedium resuspendiert und die Zellzahl auf  $1 \times 10^6$  pro mL eingestellt. Als Einfriermedium wurde FKS mit 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland) verwendet. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen mit diesem Einfriermedium versetzt und in 1,5 mL-Kryoröhrchen (Nunc, Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland) überführt.

# MATERIAL UND METHODEN

---

Mit Hilfe eines Freezing containers (Nalgene, Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland) wurden die Zellen in den Kryoröhrchen daraufhin zuerst mit 1°C pro Minute auf -80°C abgekühlt. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Das Auftauen der Zellen fand bei Raumtemperatur statt. Die Zellsuspension aus den Einfrierröhrchen wurde in eine 75 mL-Zellkulturflasche (Cellstar, Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland) mit 10 mL Medium überführt. Nach dem Auftauen wurden die Zellen für drei Tage in Zellkulturmedium mit 1% Penicillin und Streptomycin und dann im weiteren Verlauf mit Zellkulturmedium ohne Antibiotikazugabe kultiviert.

## 3.2 Analytik zur Bestimmung des pH-Wertes, der Osmolalität und des Magnesiumgehalts

Für die Analyse und Charakterisierung der Kultivierungsbedingungen während der Extrakttests und Direkten Kontakttests, wurden der pH-Wert und die Osmolalität des Zellkulturmediums, der Extrakte und des Zellkulturmediums vor und nach den Direkten Kontakttests bestimmt. Zudem wurde der Magnesiumgehalt von Reinmagnesiumextrakten bestimmt.

### Messung des pH-Wertes

Der pH-Wert wurde mit drei verschiedenen Methoden bestimmt – herkömmliches pH-Meter, Farbe des Indikators Phenol-Rot und sensorbasiertes pH-Messsystem SDR. Für die pH-Wert-Bestimmung von Extraktlösungen und Medien wurde ein herkömmliches pH-Meter (Hannah pH 211, Hannah Instruments, Kehl am Rhein, Deutschland; Sentron pH-Meter Titan X, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) verwendet.

Als zweite Methode wurde für die kontinuierlichen Messung des pH-Wertes im Bioreaktortest (Direkter Kontakttest – Variante 3) das sensorbasierte pH-Messsystem SDR (SensorDish Reader) in Verbindung mit 24-Well-pH-Sensorplatten (Hydrodishes) der Firma PreSens (PreSens - Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland) verwendet. Die pH-Sensorplatten hatten in jedem Well einen Sensorpunkt am Boden, der einen lumineszenten Farbstoff enthielt, der vom SD-Reader angeregt und die abgegebene Lumineszenz ausgelesen wurde. Die transparenten Platten wurden auf den SD-Reader gestellt, der ein Mal pro Minute den pH-Wert gemessen hat. Das Messsystem konnte pH-Werte zwischen 5 und 9 messen und an einen angeschlossenen Rechner übertragen. Der Vorteil dieser Messung war, dass das System kontinuierlich, automatisch und im geschlossenen Inkubator bei laufendem Versuch betrieben werden konnte, so dass die pH-Werte

jederzeit dem aktuellen unbeeinflussten Wert während des Versuches im Inkubator entsprechen.

Des Weiteren wurde die Farbe des frischen Zellkulturmediums, der Extrakte und der Medien vor, nach und während der Durchführung der Direkten Kontakttests erfasst. Die Lösungen basieren alle auf Zellkulturmedium und enthalten daher den Indikator Phenol Rot, welcher bei einem physiologischen neutralen pH-Wert hellrot ist. Bei einem sauren pH-Wert  $<6,8$  ist der Indikator gelb, was bei Zellkulturmedien zur Detektion von bakteriellen Kontaminationen genutzt wird. Im alkalischen Milieu ist der Indikator bei  $\text{pH} > 8,4$  rotviolett und im stark alkalischen Milieu farblos [103]. Die Struktur und Farbe von Phenol Rot für die verschiedenen pH-Werte sind in Abbildung 4 dargestellt.

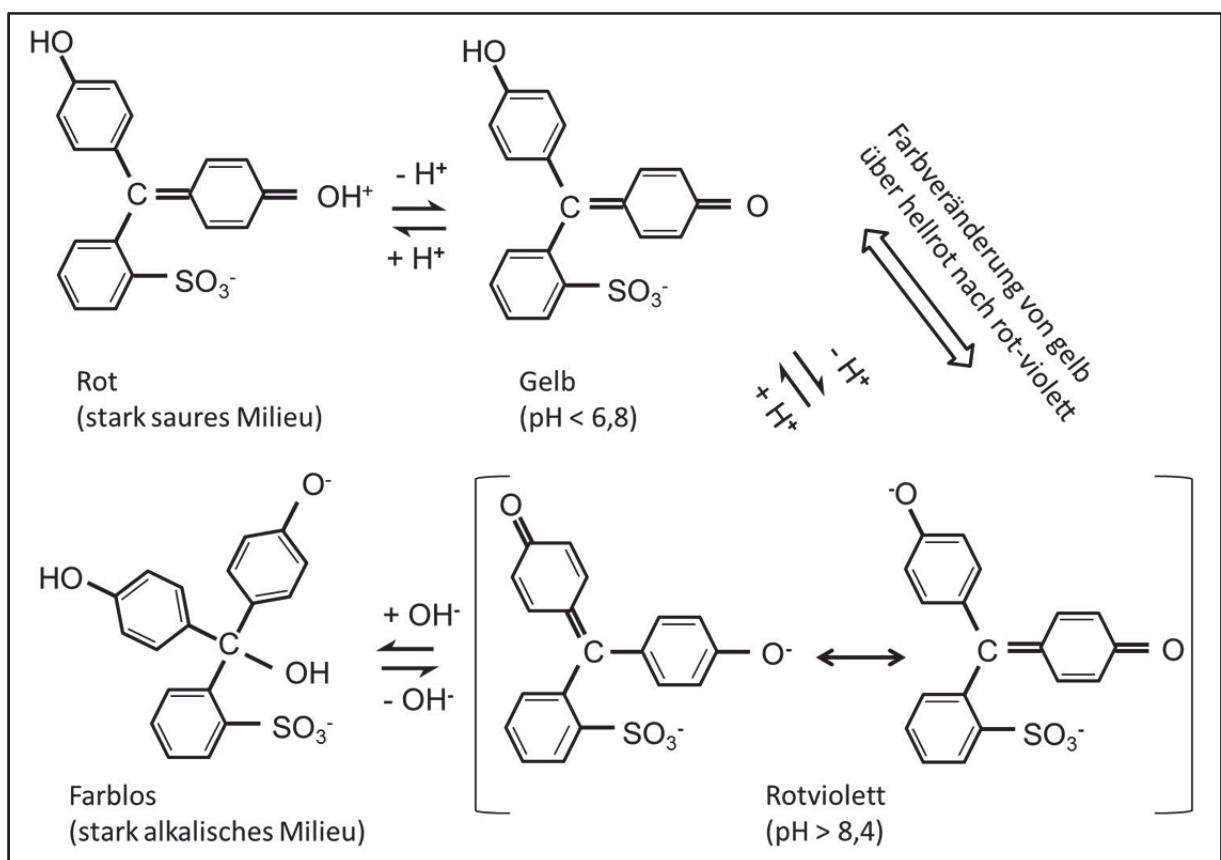


Abbildung 4: Farbumschlag und jeweilige Strukturformel des Indikators Phenol Rot beim verschiedenen umgebenden pH-Werten [103].

Bei dieser Methode wurden keine exakten pH-Werte bestimmt, sondern nur pH-Wert-Bereiche (physiologisch neutral, leicht alkalisch, stark alkalisch). Der Vorteil dieser Methode ist, dass der pH-Wert in kleinen Probengefäßen (Wells, Bioreaktorkammern) gemessen werden kann, für die die Standardsonde des pH-Meters zu dick und groß ist. Diese Methode ist auch sinnvoll im Zusammenhang mit Prüfmaterialien, da das sensorbasierte Presens-Messsystem über einen Spot misst. Auf diesem darf allerdings kein Prüfmaterial liegen, da dies die Messung verfälscht. Nicht zuletzt bietet die Farbe des Mediums den Vorteil, dass Flüssigkeitsbehälter für

## MATERIAL UND METHODEN

---

die Messung nicht in einen sterilen Bereich gebracht und dort geöffnet werden müssen. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben zudem gezeigt, dass die Farbe des Mediums bei Prüfmaterialien, die sehr stark in den Medien korrodierten farblos wurde. Dies ist ein Hinweis auf einen stark alkalischen pH-Wert während der Inkubation, der allerdings nach Beendigung der Inkubation mit einem pH-Meter nicht mehr messbar war. Warum der farblose eigentlich reversible Zustand des Indikators bei pH-Werten  $<8,5$  beibehalten wurde, war nicht klar. Allerdings zeigte sich, dass dieser farblose Zustand ein guter Indikator für die Zytotoxizität des Prüfmaterials oder Extraktes war.

### Messung der Osmolalität

Die Osmolalität der Magnesiumextrakte wurde mit einem kryoskopischen Osmometer (Gonotec 030-D, Gonotec, Berlin, Germany) bestimmt. Das analysierte Probenvolumen betrug  $50 \mu\text{L}$ . Als Kalibrationslösungen wurden  $\text{ddH}_2\text{O}$  ( $0,000 \text{ Osmol/kg}$ ) und eine Kalibrationslösung von Gonotec ( $0,300 \text{ Osmol/kg}$ ) verwendet.

### Messung des Magnesiumgehalts via ICP-MS

Die Magnesiumkonzentration von verschiedenen stark konzentrierten Reinmagnesiumextrakten wurde mit Hilfe eines Quadrupol-Massenspektrometers mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) und Octopol-Reaktionszelle (Agilent 7500c, Agilent Technologies, Tokyo, Japan) genutzt. Das Messsystem wird unter anderem für die Analyse und Quantifizierung von Spurenelementen in Meerwasser [104] und in Muskel- und Lebergewebe von gewöhnlichen Schweinswalen [105] genutzt. Ein CETAC ASX 500-Autosampler (CETAC, Omaha, Nebraska, USA) und ein mikrokonzentrischer Zerstäuber (PFA 100, Elemental Scientific, Omaha, Nebraska, USA) kombiniert mit einer *quartz double pass*-Sprühkammer wurden für das Einführen der Extrakte genutzt. Um den Background beim Hauptisotop  $^{24}\text{Mg}$  zu minimieren, wurde  $\text{H}_2$  mit einer Fließgeschwindigkeit von  $5 \text{ mL/min}$  für alle Messungen benutzt. Argon 5.0 (99.999% Reinheit) wurde als Plasmagas und Wasserstoff 5.0 (99.999% Reinheit) als Gas im Octopolreaktionssystem verwendet. Beide Gase stammten von der Firma Air Liquide (Air Liquide, Lübeck, Germany). Vor der ICP-MS Messung wurden drei Ansätze je Extraktlösung angesetzt und mit  $50 \mu\text{g}$  Rhodium (Rhodium internal ICP-MS Standard Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) als internem Standard über Nacht in 65% hochreiner Salpetersäure (Suprapur, Merck, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Vor der Messung wurden alle Proben 1/1000 mit hochreinem Wasser ( $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ; Millipore Elix 3/Milli-Q plus, Merck Millipore, Schwalbach, Deutschland) verdünnt. Um eine aussagekräftige Statistik zu erhalten wurde jede Prüflösung acht Mal gemessen. Die Isotope  $^{24}\text{Mg}$  und  $^{25}\text{Mg}$  wurden mit einer externen 6-Punkte-Kalibration des Merck ICP IV Multielement Standards (Merck, Darmstadt, Germany) quantifiziert, welcher 23 verschiedene Elemente enthält.

### 3.3 Biochemische Assays für die quantitative Messung der Zytotoxizität

Für die quantitative Ermittlung der Zytotoxizität von Prüfmaterialien empfiehlt die ISO-Norm die Verwendung der Tetrazolium-basierten Assays MTT und XTT. Allerdings hat sich im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass die Verwendung dieser Assays in Verbindung mit korrodierenden Magnesiumprüfmaterialien und Magnesiumextrakten problematisch sein kann. Daher wurden zusätzlich das Bromdesoxyuridin (BrdU)-Assay und eine Lebend/Tot-Vitalfärbung mit Calcein Acetoxymethylester (Calcein-AM) und Ethidium Homodimer-1 in die Untersuchungen miteinbezogen, um ein verlässliches unbeeinflusstes Assay für die Quantifizierung von Magnesiumprüfmaterialien zu ermitteln. Mit dem MTT- und dem XTT-Assay kann die Anzahl metabolisch aktiver Zellen quantifiziert werden. Mit dem BrdU-Assay kann dagegen die Anzahl der proliferierenden Zellen quantifiziert werden. Die Vitalfärbung ermöglicht die Quantifizierung der Anzahl von lebenden und toten Zellen.

#### 3.3.1 Kalorimetrisches MTT-Assay

Das Assay wurde nach einem etablierten Protokoll [98] durchgeführt. MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany)) wurde in PBS in einer Konzentration von 5 mg/mL gelöst und sterilfiltriert (0,22 µm, Millipore Spritzenvorsatzfilter für die Ionenchromatographie, Neolab, Heidelberg, Deutschland). Bei der Verwendung von 96-Well-Platten (Cellstar, Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland) wurden von dieser MTT-Lösung 10 µL in jedes Well zu den 100 µL Zellkulturmedium zugegeben und die Platten unter Zellkulturbedingungen 4 h inkubiert. Im Falle der Verwendung von 24-Well- oder 12-Well-Platten (Cellstar, Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland) wurde die Menge an MTT-Lösung an die höhere bereits vorhandene Menge Zellkulturmedium angepasst, so dass ein 1:11-Verhältnis gegeben war. Das gelbe wasserlösliche Tetrazoliumsalz wurde von proliferierenden Zellen in blaue wasserunlösliche Formazankristalle umgewandelt. Diese Kristalle waren unter dem Mikroskop klar erkennbar. Um diese Formazankristalle in Lösung zu bringen, wurde 1 mL Solubilisierungslösung (50 g Natriumdodecylsulphat in 500 mL 0.01 M HCl; alles von Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland) in jedes Well hinzugefügt und die Platten über Nacht weiter inkubiert. Die Säure in der Solubilisierungslösung führt zu einem Farbwechsel des Indikators Phenolrot im Medium von rot zu gelb, so dass es zu keiner Interferenz bei der Messung des blauen Formazanfarbstoffes kommt [98]. Die Bildung des blauen Formazanfarbstoffes wurde mit einem ELISA Reader (Tecan 5 Sunrise, TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim, Germany) bei der Wellenlänge 570 nm und der Referenzwellenlänge 655 nm quantifiziert.

## MTT-Assay mit Zusatzschritt

Dieses Assay wurde wie das oben beschriebene MTT-Assay durchgeführt. Allerdings wurde ein Arbeitsschritt hinzugefügt. Vor der Zugabe der MTT-Lösung wurden alle Extrakte und Zellkulturmedien durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Erst danach wurde die MTT-Lösung hinzugeführt. Um dennoch eine Interferenz mit ausgefallenen Magnesiumpartikeln auszuschließen, die sich evtl. am Boden festgesetzt hatten, wurden zusätzlich zur Medienkontrolle immer auch von allen Extrakten zellfreie Kontrollen mitgetestet.

## 3.3.2 Kalorimetrisches XTT-Assay

Für den XTT Test wurde das Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) nach Anleitung des Hersteller benutzt. Vom Prinzip ist das XTT-Assay dem MTT-Assay sehr ähnlich. Der Unterschied besteht in einem anderen Farbstoff und der fehlenden Notwendigkeit der Solubilisierung des Formazans. Das beim XTT-Assay gebildete Formazan ist wasserlöslich und muss nicht wie beim MTT-Assay durch Solubilisierungslösung in Lösung gebracht werden. Dadurch werden die Inkubationszeit und die gesamte Versuchsdurchführung deutlich verkürzt. XTT-labeling-Reagenz wurde mit *Electron-coupling*-Reagenz vermischt (5 mL + 100 µL). Bei Verwendung von 96-Well-Platten (Cellstar, Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland) wurden 50 µL dieser XTT-Lösung in jedes Well zu den bereits vorhandenen 100 µL Zellkulturmedium hinzugefügt und für 24 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Im Falle der Verwendung von 24-Well- oder 12-Well-Platten (Cellstar, Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland) wurde die Menge an XTT-Lösung an die höhere bereits vorhandene Menge Zellkulturmedium angepasst, so dass ein 1:3-Verhältnis gegeben war. Die Bildung des orangen Formazanfarbstoffes wurde mit Hilfe eines ELISA Reader bei den Wellenlängen 492 nm und 655 nm (Referenzwellenlänge) quantifiziert.

## 3.3.3 Chemolumineszentes BrdU-Assay

Für die Durchführung des BrdU-Assays wurde das „Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemolumineszent)“-Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Allen Wells wurde 5-bromo-2'-desoxyuridine (BrdU)-labeling-Lösung zugefügt und die 96-Well-Platte (Cellstar, Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland) 2 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. BrdU wird während dieses Reaktionsschrittes von proliferierenden Zellen in neu synthetisierte DNA (Desoxyribonucleinsäure) eingebaut. Das Medium wurde entfernt und die Platte für 30 min bei Raumtemperatur (RT) mit FixDenat fixiert und die DNA denaturiert. Antikörper-konjugierte Anti-BrdU-Peroxidase-Lösung wurde für 30 min bei RT auf der Platte inkubiert. Dabei wird das Enzym Peroxidase mit Hilfe einen BrdU-spezifischen Antikörpers an das BrdU-Molekül gebunden. Eine Substratmixture mit Luminol-4-iodophenol und einer stabilisierten Form von Wasserstoffperoxid

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) wurde der Platte zugegeben. Luminol wird in diesem letzten Schritt durch die Oxidation von Peroxidase in einen energetisch angeregten Zustand versetzt. Beim Rückfall in den energetischen Normalzustand werden Photonen emittiert. Nach 3 min Inkubation kann diese Lumineszenz mit einem Mikroplattenleser (Victor3, PerkinElmer, Jügesheim, Deutschland) gemessen werden. Die Einheit der gemessenen Werte ist relative Lichteinheiten pro Sekunde (*relative light units / second* (rlu/s)).

### 3.3.4 Vitalfärbung mit Calcein-AM und Ethidium Homodimer-1

Für die Vitalfärbung wurde das „LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells“ (LifeTechnologies, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Calcein-AM (4 mM) und Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) (2 mM) wurden in PBS gelöst. Die als optimal ermittelte Konzentration in der Färbelösung waren 1,6 µM Calcein-AM und 2 µM EthD-1. Die Zellen wurden mit der Färbelösung bedeckt und 20 min unter Zellkulturbedingungen im Inkubator inkubiert. Die Färbelösung wurde dann mit PBS ersetzt. Die fluoreszenzgefärbten Zellen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop fotografiert und anschließend die toten und lebenden Zellen ausgezählt.

Das verwendete Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse Ti-S, invertiert, Nikon, Düsseldorf, Deutschland) war mit einem automatischen Prior Maerzhaeuser XY-Tisch, einem automatischen Z-Trieb sowie einem Intensilight und der NIS Elements Software (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) ausgerüstet.

Der Anregungswellenlänge von Calcein ist 494 nm und die Fluoreszenzwellenlänge 517 nm. Daher wurde für den Calceinfarbstoff ein FITC-Filter (Fluoreszeinisothiocyanat) mit einer Anregungswellenlänge von 465-495 nm gewählt und die Fluoreszenz bei 505 nm gemessen. Die Anregungswellenlänge von EthD-1 in Gegenwart von DNA ist 528 nm und die Fluoreszenzwellenlänge 617 nm. Daher wurde für den EthD-1-Farbstoff ein Texas Red-Filter mit einer Anregungswellenlänge von 540-580 nm gewählt und die Fluoreszenz bei 595 nm gemessen.

## 3.4 Prüfmethode der ISO und ASTM Normen

Die Prüfung der Zytotoxizität von Prüfmaterialien wird nach ISO- und ASTM-Norm mit Extrakten des Prüfmaterials (Extrakttest) und/oder im direkten Kontakt mit dem Prüfmaterial (Direkter Kontakttest) durchgeführt. Für die Erstellung des in diesem Kapitel beschriebenen Basis-Protokolls für den Extrakttest wurden die Vorgaben der ISO Norm 10993-5 [13] und ISO Norm 10993-12 [97] befolgt. Veränderungen dieses

Protokolls wurden ebenfalls den Vorgaben der ISO-Norm folgend vorgenommen. Allerdings werden diese Veränderungen, da sie im Laufe der Versuchsdurchführung vorgenommen wurden, zum besseren Verständnis begleitend in Kapitel 5 dargestellt. Für den Direkten Kontakttest wurden drei verschiedene Varianten verwendet. Für die Erstellung des Protokolls der Variante 1 wurden die Vorgaben der ISO-Norm 10993-5 [13] und ASTM-Norm F813-07 [14] befolgt. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben allerdings gezeigt, dass eine Inkubation des Prüfmaterials auf den Zellen keine zuverlässig auswertbaren Ergebnisse brachte. Diese mögliche Problematik wird auch von den ASTM- und ISO-Normen erwähnt. Die Erstellung des Protokolls der Variante 2 wurde daher zwar nach den Vorgaben der ISO-Norm 10993-5 vorgenommen, allerdings wurden diese Vorgaben mit einem Änderungsvorschlag der ISO-Norm 10993-5 kombiniert. In diesem Protokoll wurden die Zellen daher auf den Prüfmaterialien kultiviert. Bei dieser zweiten Variante des Direkten Kontakttests konnten die Zellen nicht wie bei der Variante 1 vorkultiviert werden. Stattdessen waren die Zellen bei der Aussaat sofort im direkten Kontakt mit den korrodieren Magnesiumprüfmaterialien. Durch die statischen Versuchsbedingungen (kein Wechsel und keine Bewegung des Zellkulturmediums) waren die Zellen während der Kultivierung dem korrosionsbedingten Anstieg der Osmolalität, des pH-Wertes und der Menge an Degradationsprodukten direkt ausgesetzt. Um diese Problematik zu umgehen, wurde als dritte Variante des Direkten Kontakttests im Rahmen dieser Arbeit erstmalig ein Bioreaktor für eine dynamische Kultivierung der Zellen eingesetzt und hinsichtlich seiner Eignung untersucht. Durch den Fluss und kontinuierlichen Austausch des Medium sollte die Akkumulation von Degradationsprodukten, die Osmolalität und der pH-Wert am Prüfmaterial ähnlich wie im menschlichen Körper auf physiologischere Bedingungen gesenkt werden.

### 3.4.1 Extrakttest

Für die Bedingungen der Extraktherstellung gibt es keine absoluten Vorgaben von der ISO Norm. Stattdessen empfiehlt sie mehrere mögliche Bedingungen, um die große Bandbreite an verschiedenen Medizinprodukten abzudecken. Aus diesen müssen die für das zu testende Prüfmaterial passenden Bedingungen ausgewählt werden. Die ISO-Norm empfiehlt, ein oder mehrere Lösungsmittel einzusetzen, um sowohl polare als auch unpolare Substanzen zu extrahieren. In dieser Arbeit wurde Zellkulturmedium mit 10% Serum als Lösungsmittel ausgewählt, da dieses der komplexen Zusammensetzung der Flüssigkeiten im menschlichen Knochen am ehesten entspricht und das Zellwachstum optimal unterstützt. Zudem besitzt serumhaltiges Zellkulturmedium die Eigenschaft sowohl polare als auch unpolare Substanzen zu extrahieren. Mit reinem Zellkulturmedium ohne Serum können dagegen nur polare Substanzen extrahiert werden [13].

Des Weiteren musste ein geeignetes Verhältnis zwischen Materialoberfläche bzw. -masse und dem Lösungsmittel ausgewählt werden (Tabelle 4). Für die in dieser

Arbeit verwendeten Magnesiummaterialien eignen sich die Verhältnisse 1,25 cm<sup>2</sup>/mL und 0,2 g/mL, da die Probendicke 1,5 mm beträgt und es sich bei den Proben hauptsächlich um Gussteile handelt. In dieser Arbeit wurde ein Verhältnis von 0,2 g/mL gewählt, da dieses zu einem konzentrierteren Extrakt als bei 1,25 cm<sup>2</sup>/mL führt und bei den Verdünnungsschritten die Extraktkonzentration von 1,25 cm<sup>2</sup>/mL automatisch miterfasst wird. Bei den für die Extrakterstellung genutzten Proben entspricht das 1,25 cm<sup>2</sup>/mL-Verhältnis etwa einem 1:2 verdünnten Extrakt beim 0,2 g/mL-Verhältnis.

*Tabelle 4: Empfohlene Verhältnisse von Materialoberflächen und -massen zum Volumen des Lösungsmittels für die Extrakterstellung nach ISO 10993-12 [97].*

<b>Dicke (in mm)</b>	<b>Extraktionsverhältnis (Oberfläche bzw. Masse/Volumen)</b>	<b>Beispiele von Materialien</b>
< 0,5	6 cm <sup>2</sup> /mL	Film, Blech, Schlauchwände
0,5 – 1,0	3 cm <sup>2</sup> /mL	Schlauchwände, Platten, kleine spritzgegossene Teile
> 1,0	1,25 cm <sup>2</sup> /mL	Größere spritzgegossene Teile
Unregelmäßige feste Produkte	0,2 g/mL	Pulver, Kügelchen, Schaum, nicht absorbierbare Teile, Gussteile
Unregelmäßige poröse Produkte (Materialien niedriger Dichte)	0,1 g/mL	Membrane

Zuletzt mussten die geeigneten Inkubationsbedingungen ausgewählt werden. In dieser Arbeit wurden die Proben bei 37°C für 72 h im Lösungsmittel inkubiert, da 37°C den Bedingungen im menschlichen Knochen entsprechen. Die ISO-Norm empfiehlt bei serumhaltigen Medien keine Temperaturen höher als 37°C für die Extrahierung zu verwenden, da diese einen nachteiligen Einfluss auf die Stabilität und Chemie von Serum oder anderen enthaltenen Komponenten haben können [13]. Die Extrahierungszeit sollte laut ISO-Norm mindestens 24 h betragen. Da die Extrakte auch in verdünnten Konzentrationen getestet wurden, wurde eine längere Inkubationszeit von 72 h gewählt.

Das gewonnene Extrakt wurde sterilfiltriert und auf einen Zellrasen gegeben (Abbildung 5). Die Zellen wurden mit den Extrakten daraufhin unter Zellkulturbedingungen weitere 72 h inkubiert.

Laut ISO-Norm soll das Extrakt auf einem subkonfluenten (80% Konfluenz) Zellrasen getestet werden. Diese Subkonfluenz wurde bei den verwendeten Zelltypen durch verschieden hohe Zellzahlen bei der Aussaat der Zellen erreicht. Primär isolierte Osteoblasten wurden in einer Zellzahl von 5000 Zellen pro Well ausgesät. Die Osteosarkomazelllinie MG-63 wurde dagegen nur in einer Zellzahl von 2500 Zellen pro Well ausgesät, da diese Zellen wesentlich schneller proliferierten als

## MATERIAL UND METHODEN

---

Osteoblasten. Die Zellen wurden auf 96-Well-Platten in 100  $\mu$ L Zellkulturmedium ausgesät und für 24 h unter Zellkulturbedingungen vorkultiviert.

Die Zytotoxizität der Magnesiumextrakte wurde mit einem MTT-Assay (mit Zusatzschritt) und zusätzlich mit einer Lebend/Tot-Vitalfärbung quantifiziert.

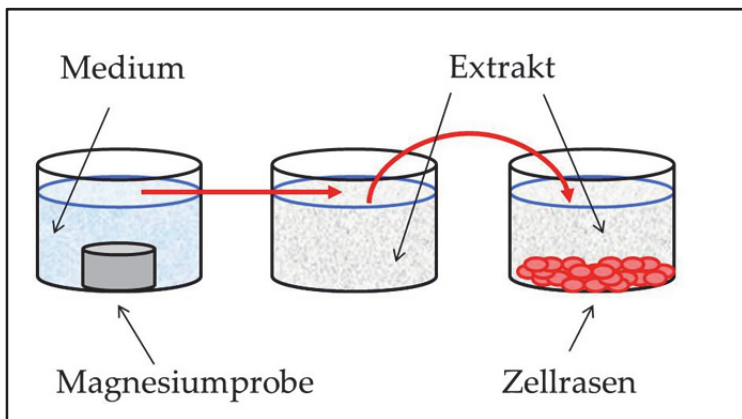


Abbildung 5: Prinzip des Extrakttests. Die Magnesiumprobe wurde im Verhältnis 0,2 g/mL in Zellkulturmedium inkubiert. Das entstandene Extrakt wurde abgenommen und auf einen Zellrasen gegeben.

### 3.4.2 Direkter Kontakttest - Variante 1: Material auf Zellen

Der Direkte Kontakttest (Variante 1) wurde nach Vorgaben der ISO 10993:5 [13] durchgeführt. Diese Vorgaben entsprechen auch denen der ASTM Norm F813-07 [14]. Bei dieser Prüfmethode wurde das Prüfmaterial wie in der Norm beschrieben auf einen subkonfluenten Zellrasen gelegt (Abbildung 6) und unter Zellkulturbedingungen inkubiert.

Die Kontaktdauer zwischen Prüfmaterial und Zellen sollte nach ISO-Norm mindestens 24 h betragen. Für eine bessere Vergleichbarkeit mit dem Extrakttest wurde eine Kontaktdauer von 72 h gewählt. Die Norm empfiehlt des Weiteren, die Zellkulturplatten mit den Zellen und Prüfmaterialien nur so wenig wie möglich zu bewegen, um ein Trauma für die Zellen zu verhindern, welches zu einer Ablösung oder Verschiebung des Zellrasens führen könnte. Das Prüfmaterial sollte etwa 10% des Zellrasens bedecken. Für diesen Test wurden zylindrische Prüfkörper mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Höhe von 1,5 mm verwendet. Die Fläche, die den Zellrasen bedeckte, betrug also 0,196  $\text{cm}^2$ . Der Prüfkörper wurde in ein Well einer 24-Well-Zellkulturplatte gegeben, welches eine Fläche von 1,9  $\text{cm}^2$  besaß. Es waren also, wie von der Norm empfohlen, 10% des Zellrasens durch den Prüfkörper bedeckt.

Um einen subkonfluenten Zellrasen zu erhalten, wurden 25.000 Osteoblasten (Zellen von zwei verschiedenen Spendern) auf 24-Well-Platten (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät und für 24 -72 h unter Zellkulturbedingungen vorkultiviert. Danach wurden die Medien erneuert und je eine

Magnesiumprüfmaterialprobe in jedes Well auf den Zellrasen gelegt und für drei weitere Tage inkubiert. Die Mediummenge pro Well betrug 1 mL. Die Zytotoxizität der Magnesiumprüfmaterialien wurde mit Hilfe einer Lebend/Tot-Vitalfärbung ermittelt.

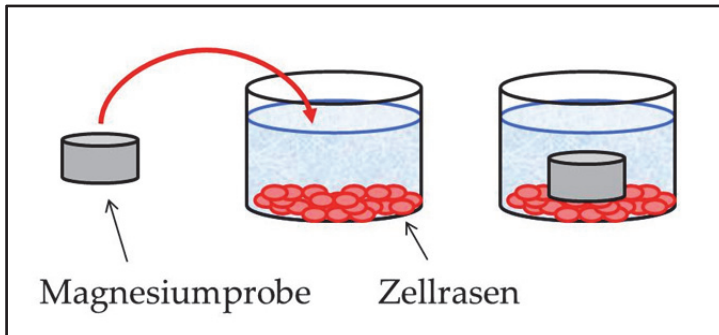


Abbildung 6: Prinzip der ersten Variante des Direkten Kontakttests. Hierbei wurde das Prüfmaterial in das Medium auf einen subkonfluenten Zellrasen gegeben und inkubiert.

### 3.4.3 Direkter Kontakttest - Variante 2: Zellen auf Material

Diese Variante des Direkten Kontakttests wurde nach Vorgaben der ISO 10993:5 [13] durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen direkt auf dem Prüfmaterial ausgesät und für drei Tage unter Zellkulturbedingungen inkubiert (Abbildung 7). Für diese Prüfmethode wurde zylindrische Prüfkörper mit einem Durchmesser von 10 mm und einer Höhe von 1,5 mm verwendet.

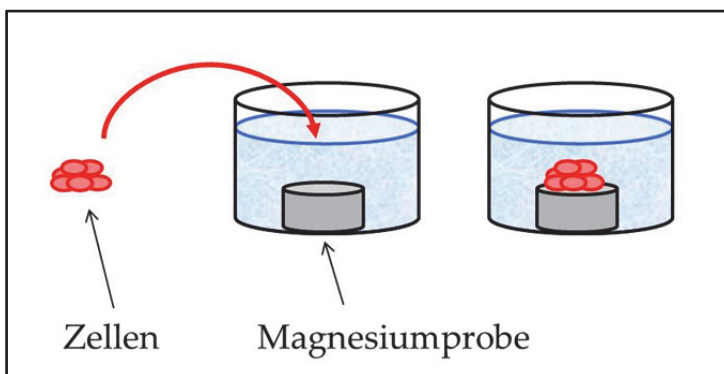


Abbildung 7: Prinzip der zweiten Variante des Direkten Kontakttests. Hierbei wurden die Zellen auf dem Prüfmaterial ausgesät.

Vor der Inkubation der Prüfmaterialien mit Zellen wurden die Prüfmaterialien in Zellkulturmedium präinkubiert, um die Zeit nach der direkten Implantation im Menschen zu simulieren. Im Zeitraum direkt nach der Implantation lagern sich als erste Reaktion des Körpers Proteine an das Implantatmaterial an. Die Präinkubation führte zu einer sichtbaren Verfärbung der Probenoberflächen. Durch die Präinkubation hatten Bestandteile des Medium, z.B. die Proteine [89], die Möglichkeit, sich auf den Proben abzusetzen. Proteine, Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) oder andere organische Verbindungen sind mögliche Kandidaten für die Bildung einer

komplexen Korrosionsschicht [92]. Erst nach dieser Präinkubation wurden Zellen auf den Proben ausgesät. Die Adhäsion von Zellen auf einer fremden Oberfläche wird durch Proteine begünstigt.

Für die Präinkubation wurden die Prüfmaterialien in je ein Well einer 12-Well-Platte gegeben und 2 h in Zellkulturmedium mit 10% Serum unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Daraufhin wurde das Medium entfernt und die Proben an Luft über Nacht getrocknet. Am darauffolgenden Tag wurden 75.000 Osteoblasten in einem 50  $\mu$ L-Tropfen auf jede Probe gegeben und für 30 min unter Zellkulturbedingungen inkubiert um eine optimale Adhäsion zu erreichen. Danach wurde 3 mL Zellkulturmedium mit 10% Serum in jedes Well gegeben und die Zellen für weitere 72 h auf den Prüfkörpern unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Die Zytotoxizität der Prüfkörper wurde mit der Lebend/Tot-Vitalfärbung gemessen.

### 3.4.4 Direkter Kontakttest - Variante 3: Zellen auf Material im Bioreaktorsystem

Die von den Normen beschriebenen Prüfverfahren sind alles statische Systeme. Die dynamischen Bedingungen im menschlichen Körper werden damit nicht erfasst. Im menschlichen Knochengewebe wird das Implantat kontinuierlich von Lymphflüssigkeiten, Blut und Extrazellulärflüssigkeiten umspült. Daher wurden die Zellen bei der dritten Variante des Direkten Kontakttests während der Kultivierung auf den Magnesiumprüfmaterialien einem kontinuierlichen Mediumfluss ausgesetzt. Ein solch dynamisches System konnte durch die Verwendung eines Bioreaktorsystems erreicht werden (Abbildung 8).

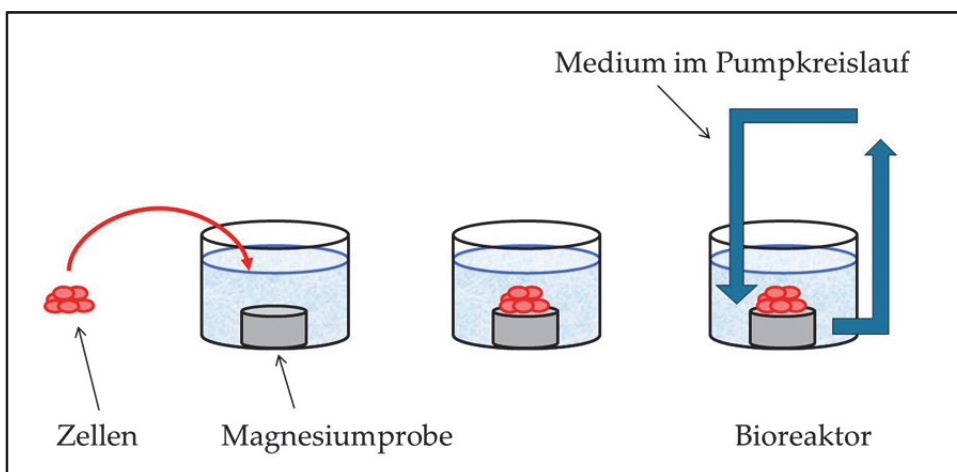


Abbildung 8: Prinzip der dritten Variante des Direkten Kontakttests (dynamisch). Die Zellen wurden auf dem Magnesiumprüfmaterial ausgesät und dann im Bioreaktor inkubiert. Das Medium befand sich in einem Pumpkreislauf und hatte eine Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min.

Der kontinuierliche, einstellbare Medienfluss sollte idealerweise zu einem Abtransport von Degradationsprodukten und einer Senkung der Osmolalität und des pH-Wertes am Prüfmaterial führen, um physiologischere Bedingungen für die

Zellen zu ermöglichen. Das Protokoll basiert auf dem Protokoll der zweiten Variante des Direkten Kontakttests. Lediglich die 72-stündige Kultivierung erfolgt im Bioreaktor anstatt auf einer 24-Well-Platte.

Für das Bioreaktorsystem wurde eine Fließkammer der Firma Medorex (Nörten-Hardenberg, Deutschland) verwendet. Diese war aus Polyetheretherketon (PEEK) gefertigt, welches autoklavierbar ist und eine hohe Chemikalienbeständigkeit besitzt [106], welche beim Einsatz von Magnesiummaterialien aufgrund der möglichen hohen lokalen pH-Werte nötig war. Die Kammer war wie eine 24-Well-Zellkulturplatte gebaut. Der Deckel hatte acht Luer-Lock-Schlauchanschlüsse (Rotilabo-Luer-Schlauchverbinder weiblich 2,4 mm; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und zwei Luer-Lock-Filteranschlüsse (Rotilabo-Luer-Schlauchverbinder männlich 2,4 mm; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland). Die Versorgung der Zellen in der Kammer mit Sauerstoff, Kohlendioxid und Luftfeuchtigkeit funktionierte ähnlich wie bei einer 24-Well-Zellkulturplatte durch die Atmosphäre im Inkubator. Die Gase und die Feuchtigkeit konnten zwischen Deckel und Kammer hinein- und hinausströmen. Zusätzlich befanden sich zwei Löcher mit Filtern im Deckel für die Be- und Entlüftung (Abbildung 9).

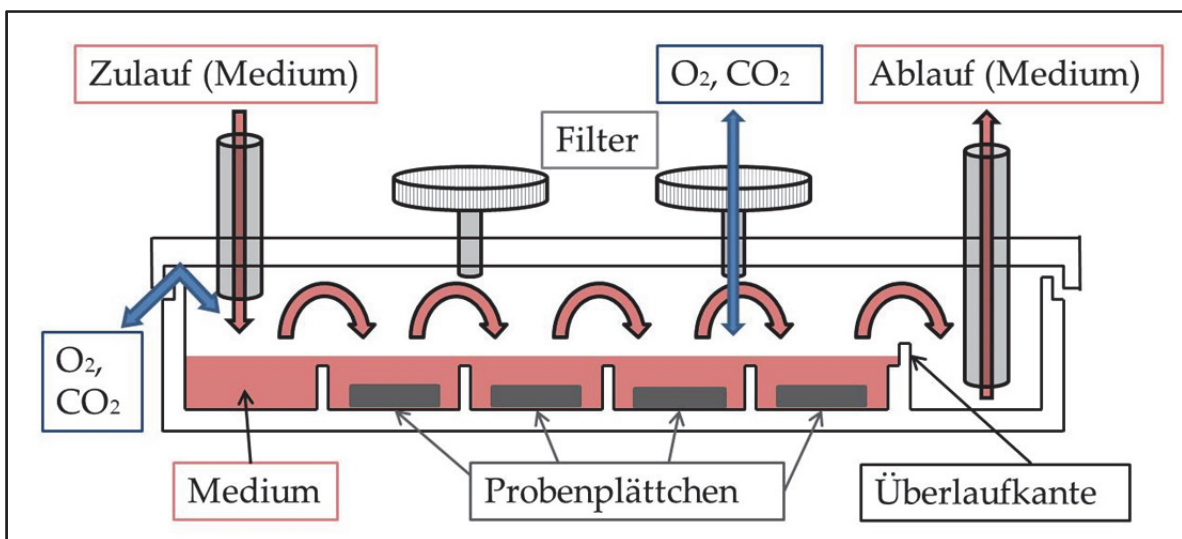


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Fließkammer mit Deckel und vier Probenplättchen.

So konnte der Betrieb der Fließkammer konventionell im Inkubator ohne zusätzliche Begasung durchgeführt werden. Im Gegensatz zu einer 24-Well-Zellkulturplatte waren die beiden äußeren 4er-Reihen der Bioreaktorkammer durch Zu- und Ablauf-Wellen ersetzt (Abbildung 10). Die Kammer hatte also 16 Wells und konnte damit 16 Proben fassen. Vier Wells waren jeweils hintereinander miteinander verbunden und bildeten ein 4er-Segment mit Zu- und Ablauf.

Es konnten pro Lauf daher vier verschiedene Materialien, vier verschiedene Medien oder vier verschiedene Geschwindigkeiten getrennt voneinander getestet werden mit einer statistisch auswertbaren Probenzahl von maximal vier. Die rechte Seite der Kammer hatte eine Überlaufkante (blau umrandet) (Abbildung 10). Die Kammer

## MATERIAL UND METHODEN

füllte sich soweit mit Flüssigkeit bis diese Kante erreicht wurde. Erst dann lief die Flüssigkeit in das Bassin dahinter, wo es aus der Kammer gesaugt wurde. Durch die Ausstattung der Kammer mit Sammelbecken am Ein- und Ausgang und einer Überlaufkante konnte eine laminare Strömung gewährleistet werden [106].

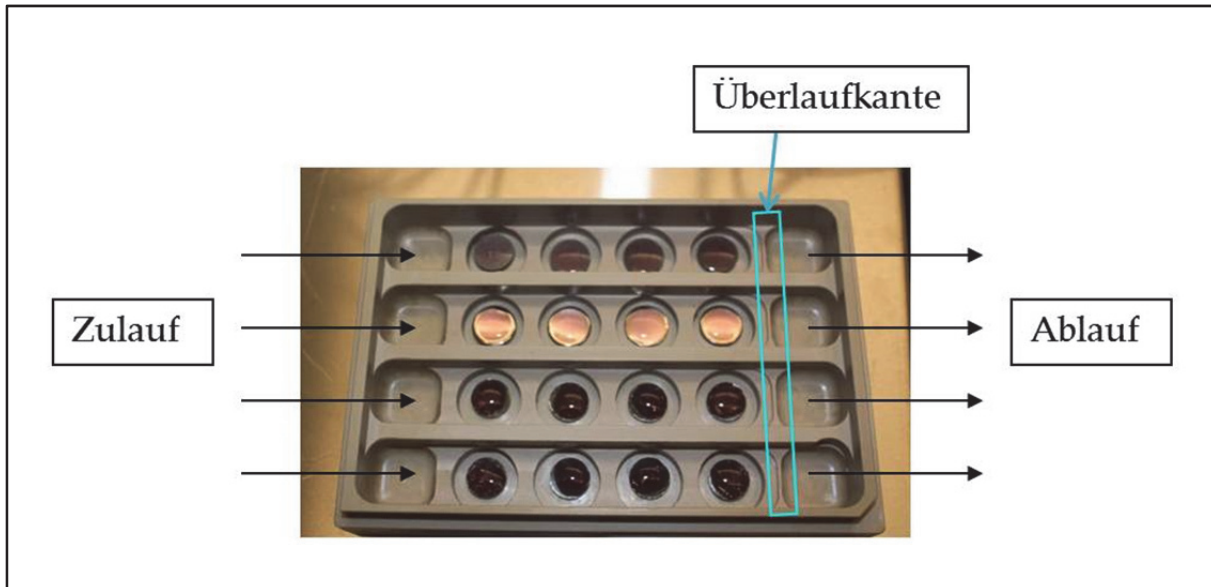


Abbildung 10: Aufbau der Fließkammer mit Magnesium- und Titanproben. Auf jedem Prüfmaterial befindet sich ein 50  $\mu\text{L}$ -Tropfen einer Zellsuspension.

Das Bioreaktorsystem bestand aus vier Vorratsgefäßen, der Fließkammer und einer Schlauchpumpe (Abbildung 11). Beim Betrieb des Fließkammersystems stand die Fließkammer innerhalb und die Vorratsflaschen und die Pumpe außerhalb des Inkubators. Dies hatte den Vorteil, dass die temperaturempfindlichen Medienzusätze wie z.B. L-Glutamin nicht dauerhaft auf 37°C erwärmt wurden. Die Gefahr, dass das Medium zu kalt in die Fließkammer gepumpt wurde, war nicht gegeben. Bei der Entwicklung des Fließkammersystems wurde die Temperatur vor und nach der Kammer gemessen [106]. Der gemessene Temperaturunterschied von 1°C konnte durch Erhöhung der Temperatur im Inkubator auf 38°C ausgeglichen werden.

Für den Teil der Schläuche, die in der Tür eingeklemmt wurden, wurden Santopren-Schläuche (3,2x1,6 mm, Medorex, Nörten-Hardenberg, Deutschland) verwendet, da diese steifer waren. Für den Rest der Schläuche wurden Silikonschläuche (3,0x1,6 mm, Neolab, Heidelberg, Deutschland) verwendet, da in diesen das Medium besser sichtbar war und daher der Medienfluss besser überwacht werden konnte. Die Schläuche wurden mit männlichen Luer-Lock-Verbindern (Rotilabo-Luer-Schlauchverbinder männlich 2,4 mm; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) an den weiblichen Luer-Lock-Verbindern der Fließkammer angeschlossen. Die verwendete Schlauchpumpe (Schlauchpumpe TL/15 E 62-1-6-3,2x1,6; Medorex, Nörten-Hardenberg, Deutschland) bestand aus vier Pumpensegmenten. Zwei Schläuche hatten Platz in einem Pumpensegment. Es konnten daher acht Schläuche pro Pumpe genutzt werden. Die Fließgeschwindigkeit der absaugenden Pumpe musste doppelt so hoch sein wie die der zuführenden Pumpe, um ein Überlaufen der Kammer zu

verhindern. Bei der genutzten Pumpe wurden daher zwei verschiedenen Rollensysteme verwendet. Je mehr Rollen am Pumpenkopf vorhanden waren, desto weniger Flüssigkeit wurde gepumpt. Durch die Verwendung von zwei verschiedenen großen Rollensystemen war die Pumpgeschwindigkeit des abpumpenden Pumpensegments (6-Rollen-System) automatisch doppelt so hoch wie die des zuführenden Pumpensegments (8-Rollen-System). Die Fließkammer, die Vorratsflaschen (100 mL Schottflaschen, Medorex, Nörten-Hardenberg, Deutschland) mit Spezialdeckeln (ausgestattet mit zwei Schlauch- und einem Filteranschluss; auch Medorex), Schläuche, Filter (Midisart 2000, 0,2 µm Polytetrafluorethylen (PTFE), Sartorius, Göttingen, Deutschland), LuerLock-Verbinder und Schlauchverbinder (Mini-Schlauchverbinder Polypropylen (PP) Gerade 2,4 mm, THGeyer, Deutschland) wurden 25 min dampfsterilisiert bei 121°C.

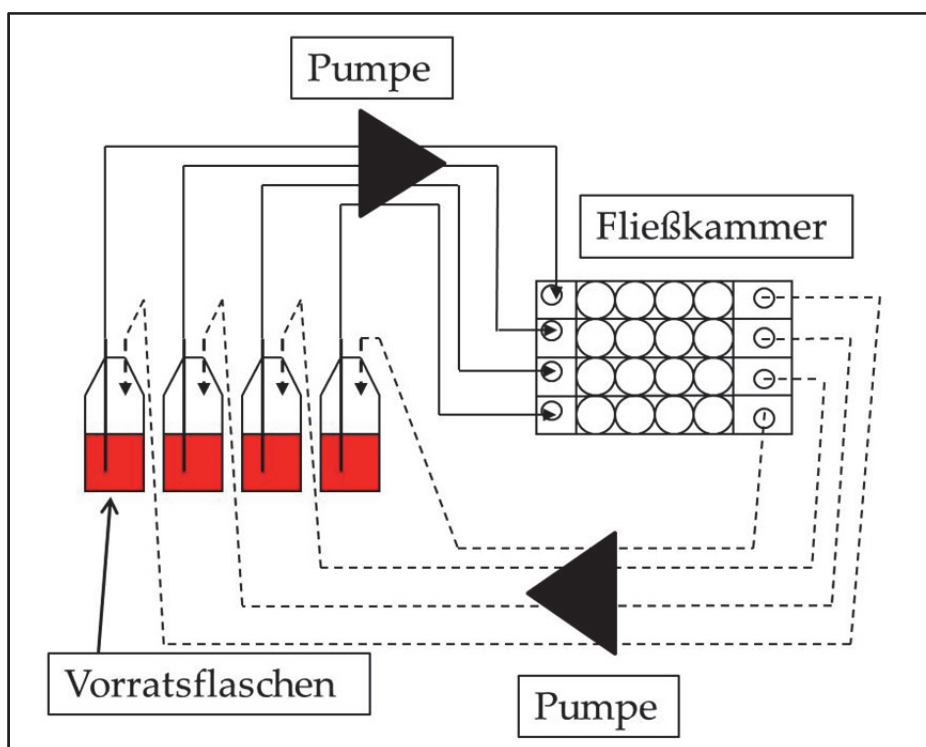


Abbildung 11: Aufbau des Bioreaktorsystems für die dritte Variante des Direkten Kontakttests.

## Zytotoxizitätstest

Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit den Ergebnissen aus dem statischen Direkten Kontakttest (Variante 2) wurde auch beim Bioreaktortest eine zweistündige Präinkubation der Prüfmaterialien in Medium angewendet. Allerdings fand diese Präinkubation im Bioreaktor mit einem Medienfluss von statt. Dafür wurde das Fließkammersystem unter der sterilen Werkbank zusammengesetzt. In jede Vorratsflasche wurden 45 mL Zellkulturmedium gegeben. Die Prüfkörper wurden mit einer Pinzette in die Wells der Fließkammer überführt. 5 mL Zellkulturmedium wurden in jedes 4er Segment der Fließkammer gegeben, um die Prüfkörper vollständig mit Flüssigkeit zu umgeben. Dies sollte verhindern, dass die Magnesiumproben beim Einschalten des Pumpensystems durch das einströmende

## MATERIAL UND METHODEN

---

Medium aufschwimmen. Die Fließkammer wurde zusammengesetzt und in den Inkubator gestellt. Die Schläuche wurden in der Pumpe eingespannt und der Pressdruck eingestellt. Die Pumpe befand sich außerhalb des Inkubators mit kleinstmöglichem Abstand zum Fließkammersystem im Inkubator. Das System lief 2 h unter Zellkulturbedingungen. Danach wurde das Medium zurück in die Flaschen gepumpt. Die Schläuche wurden aus den Pumpen entfernt und das Fließkammersystem unter die sterile Werkbank transportiert. Flüssigkeit in der Fließkammer wurde abgesaugt und die Proben an der Luft getrocknet. Das System verblieb über Nacht unter der sterilen Werkbank.

Am nachfolgenden Tag wurden Osteoblasten von Zellkulturflaschen abtrypsiniert und die Zellzahl auf 1,5 Mio. Zellen pro mL Zellkulturmedium eingestellt. Ein 50 µL-Tropfen dieser Zellsuspension wurde auf jede der Testproben pipettiert, so dass 75.000 Zellen auf jedes Prüfmaterial kamen. Die Zellen wurden für eine optimale Adhäsion als Tropfen für 30 min auf den Prüfmaterialien inkubiert. 5 mL Medium wurden in jedes der 4er-Segmente der Fließkammer gegeben, so dass sowohl die Prüfmaterialien als auch die Zellen mit Medium bedeckt waren. Die Fließkammer wurde in den Inkubator gestellt und das Bioreaktorsystem gestartet. Das System lief daraufhin unter Zellkulturbedingungen für 72 h mit der gleichen Fließgeschwindigkeit wie bei der Präinkubation. Die Zytotoxizität der Prüfmaterialien wurde mit der Lebend/Tot-Vitalfärbung gemessen.

### 3.5 Bestimmung der LD50 von Magnesiumsalz

Die letale Dosis 50 (LD 50) ist die Dosis, die benötigt wird, um 50% einer Zellpopulation abzutöten. Ziel war herauszufinden, wie die Toleranz von Magnesiumionen für die beiden in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen war. Dafür wurde Magnesium in Form des Chloridsalzes  $MgCl_2$  (Magnesiumchlorid Hexahydrat, Merck, Darmstadt, Deutschland) in Zellkulturmedium mit 10% Serum gelöst und in definierten Konzentrationen auf primären Osteoblasten und MG-63-Zellen inkubiert. Für den Test wurden 5000 Osteoblasten pro Well bzw. 2500 MG-63-Zellen pro Well auf 96-Well-Platten (Cellstar, Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland) ausgesät ( $n = 14$ ). Es wurden weniger MG-63-Zellen ausgesät, da diese wesentlich schneller proliferierten. Die Zellen wurden für eine optimale Adhäsion für 24 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Danach wurde das Medium durch die entsprechenden Salzlösungen ersetzt und die Zellen weitere 72 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Vor dem MTT Test wurden alle Medien und Salzlösungen durch frisches Medium ersetzt, um eine Interferenz der Salze mit dem Tetrazolium zu vermeiden.

Die  $MgCl_2$ -Salzlösung wurde als 100 mM Stammlösung in DMEM Glutamax-Medium mit 10% Serum angesetzt. Es wurden die Salzkonzentrationen 10 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM, 75 mM und 100 mM getestet. Die Stammlösung wurde mit

einem 0,2 µm Filter sterilfiltriert. Für die Verdünnung der Stammlösung wurde Zellkulturmedium mit 10% Serum verwendet.

### 3.6 Materialherstellung

Magnesium wird in der Automobilindustrie z.B. für Motorblöcke und Heckklappen verwendet. Daher sind die auf dem Markt erhältlichen Magnesiumlegierungen für die Bedürfnisse der Automobilindustrie optimiert. Viele dieser Legierungen enthalten Aluminium, das im Verdacht steht, Alzheimer auszulösen [107-109]. Einige Legierungen enthalten toxische bis hochtoxische Legierungselemente (Thorium, Mangan, Quecksilber).

Kommerziell derzeit erhältliche Magnesiumlegierungen sind nicht nach medizinischen Richtlinien hergestellt. Die genaue Zusammensetzung der Materialien kann variieren und unbekanntes Beimengungen anderer Elemente enthalten. Häufig vorkommende Verunreinigungen sind Kupfer, Eisen, Beryllium und Nickel [7]. Um ein Medizinprodukt herzustellen ist es notwendig, die genaue Zusammensetzung des Materials bei jeder Herstellung zu gewährleisten und Verunreinigungen auf ein Minimum zu senken.

Die Legierungselemente sind entscheidend für die Entwicklung von Magnesiumimplantaten mit einstellbarem Korrosionsverhalten. Um eine Bandbreite möglicher Abbaugeschwindigkeiten abzudecken, wurden im Rahmen dieser Arbeit für die Herstellung der Prüfmaterien die Legierungselemente Neodym, Yttrium und Gadolinium (Seltene Erden), sowie Calcium und Silber verwendet.

Seltene Erden weisen im mM-Bereich eine geringe Zytotoxizität aus [110, 111]. Das hochlösliche Element Gadolinium ist als Legierungselemente hinsichtlich der Zytotoxizität besser geeignet als Yttrium. Auch das weniger lösliche Element Neodym ist als Legierungselemente geeignet. Aufgrund der in der Studie gezeigten geringen Zytotoxizität der Seltenen Erden wurde in dieser Arbeit für die Prüfmaterien, die seltene Erden (Yttrium, Gadolinium, Neodym) enthalten, eine leichte Zytotoxizität erwartet. Silber wurde im Rahmen dieser Arbeit in zwei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (Magnesium mit 2 Gew.-% und 6 Gew.-% Silber). Silber hat eine antimikrobielle Wirkung und bietet daher die Möglichkeit, Infektionen nach der Implantation des Magnesiumimplantats zu verhindern. Da gegossenes Magnesium mit 6 Gew.-% Silber im Vergleich zu den anderen Legierungen sehr stark korrodierte wurde dieses Material als „Worst Case“ verwendet. Die Verwendung von Calcium als Legierungselement sorgt laut Literatur für eine Reduzierung der Korrosionsaktivität von Magnesium [112, 113] und führte im Tiermodell zu einer guten Biokompatibilität im Knochen [114, 115]. Dieses Material sollte den Idealfall einer besonders gut verträglichen Legierung darstellen.

Für die Herstellung der Proben wurden in dieser Arbeit drei verschiedene Prozesse genutzt - Tütenguss, Kokillenguss und Sintern. Kokillenguss und Tütenguss sind sehr ähnliche Prozesse. Der Kokillenguss ist ein etabliertes Standardgießverfahren und führt zu einer größeren Menge an Ausgangsprobenmaterial. Beim Tütengussverfahren wird im Vergleich zum Kokillenguss eine wesentlich schnellere Abkühlgeschwindigkeit genutzt und deutlich weniger Ausgangsprobenmaterial erzeugt. Mittels Tütenguss hergestellte Materialien verfügen über eine geringe Porosität ohne Risse oder Einschlüsse [116], eine homogene Legierungsverteilung und fehlende Makroseigerung [116]. Makroseigerung entsteht bei der Erstarrung des Gussblocks. Dies sind lokale Entmischungen, d. h. Unterschiede in der Zusammensetzung des erstarrenden Gussstückes in Bezug auf die Gesamtschmelze. Verunreinigungen sammeln sich in der Restschmelze an, da deren Löslichkeit im Festkörper geringer ist als in der Schmelze. Eine Reduzierung von Verunreinigungen führt zu einer geringeren galvanischen Aktivität innerhalb des Materials und damit zu einer Reduktion der Korrosionsrate. Der Sinterprozess von Magnesium ist ein unverzichtbarer Prozessschritt für das Spritzgussverfahren. Spritzgießen bietet die Möglichkeit fast fertige Produkte herzustellen. Damit kann durch Spritzgießen ein Implantat in seiner nahezu fertigen Form hergestellt werden. Durch das Wegfallen von vielen weiteren Bearbeitungsschritten werden Kosten, Zeitaufwand und Material gespart. Des Weiteren bietet der Sinterprozess die Möglichkeit, die Porosität des Materials einzustellen. Bisher ließ sich Magnesium bisher nur schlecht oder gar nicht sintern. Im Helmholtz-Zentrum Geesthacht wurde der Sinterprozess erfolgreich optimiert. Der Sinterprozess wird durch die Oxidschicht auf Magnesiumpartikeln verhindert. Durch das Hinzufügen von Calcium wird ein erfolgreicher Sinterprozess ermöglicht [117], da dieses Element eine höhere Affinität zu Sauerstoff hat und diesen während des Sintervorgangs bindet. Alle drei Herstellungsprozesse sind potentiell geeignete Methoden für die Herstellung von Magnesiumimplantaten in der Zukunft.

Die Kombination verschiedener Legierungen und Herstellungsprozesse lieferte eine große Bandbreite an Degradationsgeschwindigkeiten, die als Basis für die Versuche dienten

Als Referenzmaterial wurden in der Regel Reintitan der Firma DOT (Rostock, Deutschland) sowie Reinmagnesium (cpMg) verwendet.

### **3.6.1 Gießmethoden (KG, TG)**

#### **Kokillenguss (KG)**

Die Prüfkörper aus Reinmagnesium (99.98%, Hydro Magnesium, Norway) (cpMg(KG)), Magnesium mit 4 Gew-% Yttrium (Mg4Y(KG)), Magnesium mit 2 Gew-% und 6 Gew-% Silber (Mg2Ag(KG), Mg6Ag(KG)) wurden mittels Kokillenguss hergestellt. Das Reinmagnesium wurde in Schutzatmosphäre (Argon+2%

Schwefelhexafluorid, 1 L/min) bei 750°C geschmolzen, um die Magnesiumschmelze vor Oxidation zu schützen. Nach der Zugabe der reinen Legierungselemente wurden die Schmelzen für 30 min mit 200 U/min gerührt und dann in eine vorgeheizte Form (550°C) aus Edelstahl abgegossen. Um die Reinheit der Gussteile zu gewährleisten, wurde die Schmelze durch einen phosphatfreien, nicht keramischen Gießfilter mit Schaumstruktur (Foseco SIVEX FC, Foseco GmbH, Borken, Germany) in die Form geschüttet. Die Schaumstruktur des Filters beruhigt die Strömung des aus dem Gießfilter austretenden flüssigen Metalls und vermindert so Turbulenzen, die zu Lufteinschlüssen und Oxidbildung während der Formfüllung beitragen können. Aus den erhaltenen Gussblöcken wurden lange Zylinder mit einem Durchmesser von 5 mm bzw. 10 mm funkenerodiert. Von diesen Zylindern wurden dann mittels Funkenerosion zylindrische Probenkörper mit einem Durchmesser von 5 mm bzw. 10 mm und einer Höhe von 1,5 mm hergestellt. Die Proben wurden im letzten Schritt mit Wasser und Siliziumcarbid (SiC)-Schleifpapier (2400er Körnung) poliert.

### **Tütenguss (TG)**

Die Herstellung erfolgte nach einem Protokoll von Elsayed [116]. Prüfkörper aus Reinmagnesium (99.95%) (cpMg(TG)), Magnesium mit 0,6 Gew.-%, 0,8 Gew.-% und 1 Gew.-% Calcium (Mg0.6Ca(TG), Mg0.8Ca(TG), Mg1Ca(TG)) sowie Magnesium mit 10 Gew.-% Gadolinium und 1 Gew.-% Neodym (Mg10Gd1Nd(TG)) sowie Magnesium mit 6 Gew.-% Silber (Mg6Ag(TG)) wurden mittels Tütenguss hergestellt. Das Reinmagnesium wurde in Schutzatmosphäre (Argon+2% Schwefelhexafluorid, 1 L/min) bei 750°C geschmolzen. Nach Zugabe der reinen Legierungselemente, wurden die Schmelzen für 15 min mit 145 U/min gerührt, dann in eine vorgeheizte Form (600°C) aus Edelstahl gegossen und bei 690°C für 30 min gehalten. Die Schmelze wurde durch langsames Eintauchen in laufendes Wasser (15°C) gleichmäßig abgekühlt, um einen Guss mit einer Größe von 55 mm x 110 mm x 200 mm zu erhalten. Aus den Blöcken wurden erst lange Zylinder mit einem Durchmesser von 5 mm bzw. 10 mm funkenerodiert. Von diesen Zylindern wurden dann die Probenkörper mit einem Durchmesser von 5 mm bzw. 10 mm und einer Höhe von 1,5 mm mittels Funkenerosion hergestellt. Die Proben wurden im letzten Schritt mit Wasser und SiC (2400er Körnung) poliert.

### **3.6.2 Sintermethode (S)**

Reinmagnesium (cpMg(S)) und Magnesium mit 1 Gew.-% Calcium (Mg1Ca(S)) wurden durch manuelles Pressen und Sintern gefertigt. Die Partikelgrößen aller eingesetzten Pulver sind in Tabelle 5 angegeben.

Bei dem verwendeten cpMg(S)-Pulver sind alle Partikel <75 µm und davon 80% der Partikel <45 µm. Die Partikel des MgCa1(S)-Pulvers besitzen eine Größe von <63 µm. Aus den Pulvern wurden zylindrische Proben direkt durch das trockene manuelle

# MATERIAL UND METHODEN

---

Pressen in einer Glovebox (Unilab, MBraun, Garching, Deutschland) unter Argon in einer Handpresse (Enerpac RC55, Enerpac, Düsseldorf, Deutschland) mit 100 MPa hergestellt. Im Ofen (XRetort, Xerion, Freiberg, Deutschland) wurden die Proben daraufhin unter Argon 6.0 Schutzatmosphäre 64 h bei 605°C gesintert. Die zylindrischen Proben für die Extrakterstellung waren 8 mm im Durchmesser und 12 mm in der Höhe. Für die Durchführung des Direkten Kontakttest (Variante 1) wurden zylindrische Proben von 4 x 4 mm verwendet. Für den Direkten Kontakttest (Variante 3) wurden zylindrische Proben mit einem Durchmesser von 10 mm und einer Höhe von 15 mm hergestellt. Diese wurden danach mit einer Diamantschneidemaschine (Isomet Plus, Bühler, Deutschland) in 1,5 mm dicke Scheiben geschnitten.

Tabelle 5: Eingesetzte Pulver für die Herstellung der Sinterproben.

Legierung	Partikelgröße	Eingesetzte Pulver	Hersteller
cpMg(S)	1 Pulver mit: 20%: 45-75 $\mu\text{m}$ 80%: <45 $\mu\text{m}$	Reinmagnesium (99,96%)	Tropag HH, 1996
Mg 1Ca(S)	100%: < 63 $\mu\text{m}$	Reinmagnesium (99,96%)	Tropag HH, 1996
		Mg-7,63Ca	ZfW-Clausthal-Zellerfeld

### 3.6.3 Probensterilisation

Die Magnesiumproben wurden für 20 min mit 100% Isopropanol (2-propanol, Merck, Darmstadt, Deutschland) im Ultraschallbad gereinigt. Danach wurden die Proben in der *In Core Irradiation (ICI) Facility* des Forschungsreaktors Geesthacht FRG-1 mit einer totalen Dosisleistung von 29 kGy gammasterilisiert.

Die Titanproben wurden 20 min in einer 2%igen Hellmanex-II-Lösung (Hellma, Müllheim, Deutschland) ins Ultraschallbad (Sonorex, Bandelin, Berlin, Deutschland) gegeben. Nach zweimaligem Spülen mit ddH<sub>2</sub>O wurden die Proben 20 min in Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland), dann 20 min in 100% Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) und zuletzt 2 x 20 min in ddH<sub>2</sub>O ins Ultraschallbad gegeben. Nach dem Trocknen der Proben an der Luft, wurden diese in Autoklaviertüten im Autoklaven bei 121°C und 2 bar 20 min dampfsterilisiert.

### 3.6.4 Korrosions- und Degradationsverhalten der Prüfmateriale

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Ausgangsmaterialien der Implantatmaterialherstellung verwendet. Diese Materialien werden in der Literatur auch als *as-cast* (gegossen) oder *as-sintered* (gesintert) bezeichnet. Diese Materialien repräsentieren Rohmaterialien und stellen damit die Eigenschaften im unbehandelten und damit ungünstigsten Zustand dar. Durch Strangpressen,

Temperaturbehandlungen, Beschichtungen, Walzen oder Oberflächenbehandlungen können im weiteren Verlauf der Implantatentwicklung die mechanischen und korrosionsspezifischen Eigenschaften der Ausgangsmaterialien an die später benötigten Implantat-Eigenschaften angepasst werden. So kann z.B. durch Strangpressen (*as-extruded*) oder Walzen (*as-rolled*) der *as-cast*-Magnesiummaterialien die Korrosionsbeständigkeit erhöht werden. Li et al [73] zeigten, dass weiterverarbeitete Mg1Ca-Magnesiummaterialien (*as-extruded* und *as-rolled*) im Vergleich zu *as-cast*-Magnesiummaterial etwa 7-8 Mal langsamer degradierten und eine 5 Mal geringere Wasserstoffentwicklung als das *as-cast*-Material aufwiesen. In dieser Arbeit wurden trotzdem die Rohmaterialien verwendet, um den maximalen Einfluss des Materials auf die zu untersuchenden Tests zu ermitteln.

Für einen Teil der in dieser Arbeit verwendeten Prüfmaterialien wurde die initiale Korrosionsgeschwindigkeit bei Raumtemperatur an Luft in Zellkulturmedium mit und ohne Serumzugabe ermittelt. Diese elektrochemische Messung wurde von Herrn Dr. Tie Di vom Helmholtz-Zentrum Geesthacht an der Charité in Berlin in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Müller durchgeführt. Die Korrosionsgeschwindigkeiten der Prüfmaterialien wurde hierbei durch zyklische Voltammetrie mit Hilfe eines „Mini Cell System“-Setups, einem Potentiostaten (EI 1286, Schlumberger, München, Deutschland) und der Software Corrware (Scribner Associate Incorporated, Southern Pines, USA) bestimmt [77, 95, 118, 119]. Bei dieser elektrochemischen Analyse werden Strom-Spannungs-Kurven gemessen, aus denen dann die Korrosionsraten bestimmt werden können. Problematisch bei Standardkorrosionsmethoden nach ISO- und ASTM-Normen ist, dass große Proben separat angefertigt werden müssen. In klassischen Korrosionsmesszellen werden Prüfkörper mit einer Arbeitsfläche von 1 cm<sup>2</sup> benötigt. Beim hier verwendeten Mini Cell System-Setup für die elektrochemische Analyse betrug die Arbeitsfläche nur 0,008 cm<sup>2</sup>. Dadurch konnte die Messrate erhöht und damit die Messzeit deutlich verkürzt werden. Dies bot den Vorteil, dass eine mögliche beeinträchtigende Wasserstoffentwicklung vermieden werden konnte [77]. Zudem konnten die gleichen kleinen Prüfkörper verwendet werden, wie für die Prüfung der Zytotoxizität.

Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse für die initiale Korrosion direkt nach Kontakt mit den Elektrolytlösungen. Hierbei zeigte sich, dass Magnesium mit 6 Gew.-% Silber mit Abstand die größte Korrosionsgeschwindigkeit besaß. Allerdings spiegelt diese Messung nur die initiale Korrosion wieder. Das Degradationsverhalten der Prüfmaterialien bei dreitägiger Inkubation in Serum-haltigen Zellkulturmedium unterschied sich von den Ergebnissen der initialen Korrosion. Prüfmaterialien aus Mg0,6Ca(TG), Mg0,8Ca(TG), Mg1Ca(TG), Mg1Ca(S), Mg2Ag (TG), Mg2Ag(KG) und Mg10Gd1Nd(TG) waren nach drei Tagen noch intakt. Bei cpMg(TG), cpMg(KG), cpMg(S), Mg4Y(KG), Mg6Ag(TG) und Mg6Ag(KG) degradierten die Prüfmaterialien so stark, dass der Zerfall sichtbar war.

# MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 6: Korrosionsgeschwindigkeiten von einigen in dieser Arbeit verwendeten Magnesiumlegierungen, gemessen bei Raumtemperatur in Zellkulturmedium mit und ohne Serum mit einem Mini Cell Setup (Elektrochemische Korrosionmessung) (Tie Di, Helmholtz Zentrum Geesthacht, nicht publiziert).

Magnesiumlegierung	Korrosionsgeschwindigkeit [mm / Jahr]	
	DMEM	DMEM + FKS
cpMg (TG)	0,68	0,47
Mg 0,6Ca (TG)	0,74	0,52
Mg 10Gd 1Nd (TG)		0,61
Mg 1Ca (TG)	0,84	0,65
Mg 6Ag (TG)	1,43	

## 3.6.5 Verwendete Prüfmaterialien

Für die Eignungsanalysen der biochemischen Assays (Tabelle 7), des Extrakttests (Tabelle 8) und des Direkten Kontakttests (Tabelle 8) wurden sowohl langsamer degradierende Prüfmaterialien eingesetzt, die nach drei Tagen noch intakt waren, als auch schneller degradierende, die innerhalb dieses Zeitraums bereits sichtbare Anzeichen eines Zerfalls zeigten.

Tabelle 7: Mit X sind die Prüfmaterialien gekennzeichnet, die in Kapitel 4 für die Eignungsanalyse der biochemischen Assays eingesetzt wurden. Dabei steht Ext für „Extrakttest“, DK für „Direkter Kontakttest“, oZ für „ohne Zusatzschritt“ und mZ für „mit Zusatzschritt“. Grau markierte Legierungen besitzen ein schnelles Degradationsverhalten und zeigten bereits innerhalb der dreitägigen Inkubation in Zellkulturmedium einen sichtbaren Zerfall. Weiß markierte Felder zeigen langsamer degradierende Legierungen, die nach drei Tage noch intakt waren.

Legierung	MTT-Assay			XTT-Assay		BrdU	Lebend/Tot-Vitalfärbung	
	Ext		DK	Ext	DK	Ext	Ext	DK
	oZ	mZ						
cpMg (TG)		X						X
cpMg (KG)	X	X	X	X	X	X	X	
cpMg (S)	X		X	X	X			
Mg 4Y (KG)							X	
Mg 6Ag (KG)		X	X				X	X
Mg 2Ag (KG)		X					X	
Mg 0,6Ca (TG)		X					X	X
Mg 0,8Ca (TG)		X						
Mg 1Ca (TG)		X						X
Mg 1Ca (S)	X	X	X	X	X			
Mg 10Gd 1Nd (TG)		X					X	X

Für den Bioreaktor werden in Kapitel 6.3 allerdings nur die Ergebnisse für Prüfmaterialien gezeigt, die drei Tage lang intakt blieben, da der Zerfall von

Prüfmaterialien zu einem Verstopfen der Schläuche und damit zu einem vorzeitigen Abbruch der Experimente führte.

*Tabelle 8: Mit X sind die Prüfmaterialien gekennzeichnet, die in Kapitel 5 und 6 für die Eignungsanalyse der Prüfmethode Extrakttest und Direkter Kontakttest eingesetzt wurden. Grau markierte Legierungen besitzen ein schnelles Degradationsverhalten und zeigten bereits innerhalb der dreitägigen Inkubation in Zellkulturmedium einen sichtbaren Zerfall. Weiß markierte Felder zeigen langsamer degradierende Legierungen, die nach drei Tage noch intakt waren.*

Legierung	Extrakttest	Direkter Kontakttest		
		Variante 1	Variante 2	Variante 3
cpMg (TG)		X	X	X
cpMg (KG)	X			
Mg 6Ag (TG)		X		
Mg 6Ag (KG)	X			
Mg 2Ag (KG)	X			
Mg 0,6Ca (TG)	X	X	X	X
Mg 1Ca (TG)			X	X
Mg 10Gd 1Nd (TG)	X		X	X

## 3.7 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Versuche wurde das Programm SigmaPlot (Systat Software, Erkrath, Deutschland) eingesetzt. Zuerst wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Normalverteilung der Mittelwerte wurde nach Shapiro-Wilk überprüft. Der Mittelwertvergleich von mehreren Stichproben erfolgte dann mit einer Varianzanalyse (*One-Way ANOVA*). Dafür wurde zuerst die Homogenität der Varianzen überprüft. Bei Normalverteilung und Homogenität der Varianzen wurde die Holm-Sidak-Methode für den Vergleich von Ergebnissen mit der Kontrollgruppe (*multiple comparison versus control group*) angewendet. Wenn diese Voraussetzungen nicht erfüllt waren, wurde erst eine Rangvarianzanalyse (*ANOVA on ranks*) nach Kruskal-Vallis durchgeführt und dann die Dunn's-Methode für den Vergleich von Ergebnisse mit der Kontrollgruppe (*multiple comparison versus control group*) verwendet. Unterschiede wurden bei einem Signifikanzwert unterhalb von  $p = 0,05$  als signifikant betrachtet. Als Alpha-Niveau ( $\alpha$ , annehmbare Wahrscheinlichkeit eines unrichtigen Schlusses auf eine Wirkung) wurde  $\alpha = 0.05$  verwendet.



## 4. BIOCHEMISCHE ASSAYS FÜR DIE QUANTIFIZIERUNG DER ZYTOTOXIZITÄT VON MAGNESIUMMATERIALIEN

Zuverlässige biochemische Zytotoxizitäts-Assays sind die Grundlage für aussagekräftige *in vitro*-Zytotoxizitäts-Prüfmethoden zur quantitativen Messung der Zytotoxizität von Magnesiummaterialien. Bei der Korrosion von Magnesiumprüfmaterialien entstehen hohe alkalische pH-Werte, stark erhöhte Osmolalitäten und es kommt zu einer Freisetzung der Legierungselemente und hochreaktivem Magnesium durch den Abbau des Prüfmaterials. Bei der Entwicklung und Festsetzung der Standards können solche spezifischen Bedingungen nicht berücksichtigt werden, da die Standards für verschiedenste medizinische Geräte und Materialien konzipiert sind. Die ISO-Norm empfiehlt für die Prüfung von potentiellen Implantatmaterialien die Verwendung der Tetrazolium-basierten Assays MTT und XTT. Eine umfassende Analyse der Eignung dieser empfohlenen Assays für korrodierende Magnesiummaterialien war daher der erste Schritt zur Ermittlung eines zuverlässigen Testsystems. Die Ergebnisse dieser Untersuchung haben gezeigt, dass die Anwendung dieser Assay-Art problematisch ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher neben der Tetrazolium-basierten Assay-Art zudem zwei weitere Assay-Arten ausgewählt, die auf einem anderen Reaktionsmechanismus basieren, und hinsichtlich ihrer Eignung untersucht. Die eine Assay-Art war das chemolumineszente ELISA-basierte BrdU-Assay und die andere eine Lebend /Tot-Vitalfärbung mit Calcein-AM und EthD-1. Für die umfassende Beurteilung der Eignung der drei Assay-Arten wurde hierbei ermittelt, ob diese Assays im indirekten (Extrakttest) oder direkten (Direkter Kontakttest) Kontakt mit Magnesiummaterialien zu zuverlässigen Ergebnissen oder Falsch-Positiv- oder Falsch-Negativ-Ergebnissen führen.

### 4.1 Tetrazolium-basierte Assays MTT und XTT

Die erste überprüfte Assay-Art waren die häufig verwendeten und von der ISO Norm 10993:5 [13] empfohlenen Tetrazolium-basierten Assays MTT und XTT. Im Verlaufe der Untersuchungen zeigte sich, dass die Verwendung der Tetrazolium-basierten Assays zu Falsch-Positiv-Ergebnisse führte. Um die Ursache für diese Beeinflussung zu ermitteln wurde zuerst überprüft, ob die Kontaktart (Extrakttest oder Direkter Kontakttest) ein einflussnehmender Faktor ist. Des Weiteren wurde ermittelt, ob die bei der Korrosion von Magnesiummaterialien entstehenden alkalischen pH-Werte, die erhöhten Magnesiumkonzentrationen und die damit verbundenen erhöhten Osmolalitäten die Testergebnisse verfälschen.

### 4.1.1 Einfluss der Kontaktart

#### Extrakttest

Für die Analyse der Beeinflussbarkeit des MTT- und XTT-Assays durch unverdünnte Extrakte von Magnesiumprüfmaterialien, wurden zwei schneller (cpMg(S), cpMg(KG)) und ein langsamer degradierendes Prüfmaterial eingesetzt. Gemessen wurden die reinen Extrakte ohne Zellen, Zellkulturmedium und Zellen in Zellkulturmedium. Die Grafik in Abbildung 12 zeigt, dass es im Falle des Extrakttests zu einer Beeinflussung des MTT- und XTT-Assays durch die Magnesiumprüfmaterialien kam. Die Redoxfarbstoffe MTT und XTT sollen im Normalverfahren durch Zellen in Formazan umgewandelt werden. Abbildung 12 zeigt allerdings, dass diese Umwandlung auch in Abwesenheit von Zellen durch die Inkubation mit Extrakten der Magnesiumprüfmaterialien stattfinden kann.

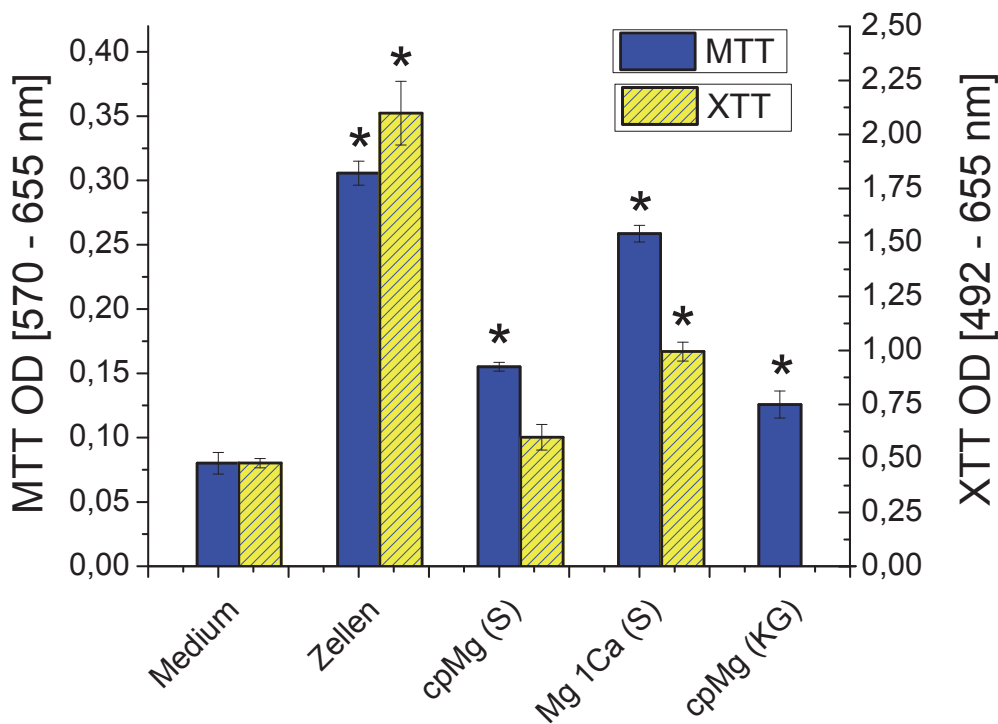


Abbildung 12: Die Grafik zeigt die im MTT- und XTT-Assay gemessene optische Dichte für Zellkulturmedium, Zellen und 100%-Extrakte. Gezeigt werden die drei Prüfmaterialien, die in Abwesenheit von Zellen zur stärksten Beeinflussung geführt haben. Zum Vergleich ist die Umsetzung des Farbstoffs durch Zellen dargestellt, um das Normalverfahren zu zeigen. Medium wurde als Negativkontrolle verwendet. \* ein Stern steht für signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zum Medium. Für cpMg(KG) wurde nur das MTT-Assay durchgeführt. (MTT:  $n=8$  für cpMg(S) und Mg1Ca(S);  $n=16$  für cpMg(KG) und Zellen; XTT:  $n=6$  für cpMg(S) und Mg1Ca(S);  $n=30$  für Zellen)

Dargestellt sind die Ergebnisse der Legierungen, die die Assays am stärksten beeinflusst und zu Falsch-Positiv-Ergebnissen geführt haben. Im MTT-Assay waren die gemessenen Werte für die Extrakte von cpMg(S), Mg1Ca(S) und cpMg(KG) signifikant erhöht im Vergleich mit den Werten des Kontrollmediums (ANOVA on ranks,  $H=65,707$ , degrees of freedom (df)=4,  $P < 0,001$ ). Im XTT-Assay war der OD-Wert

(Optische Dichte) des Mg1Ca(S)-Extraktes signifikant höher im Vergleich zur Kontrolle (*ANOVA on ranks*,  $H=55,420$ ,  $df=3$ ,  $P<0,001$ ). Die Zellkontrolle führte zur gewünschten signifikanten Erhöhung der optischen Dichte.

### Extrakttest mit Erneuerung des Medium

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Tetrazolium-Farbstoff MTT in Abwesenheit von Zellen durch Magnesiumextrakte umgewandelt werden konnte und so Falsch-Positiv-Ergebnisse entstanden. Durch Ersetzen der Extrakte und des Zellkulturmediums durch frisches neues Zellkulturmedium vor der Zugabe des MTT-Farbstoffes, konnte diese zellunabhängige Umsetzung des Tetrazolium-Farbstoffes unterbunden und Falsch-Positiv-Ergebnisse verhindert werden (Abbildung 13).

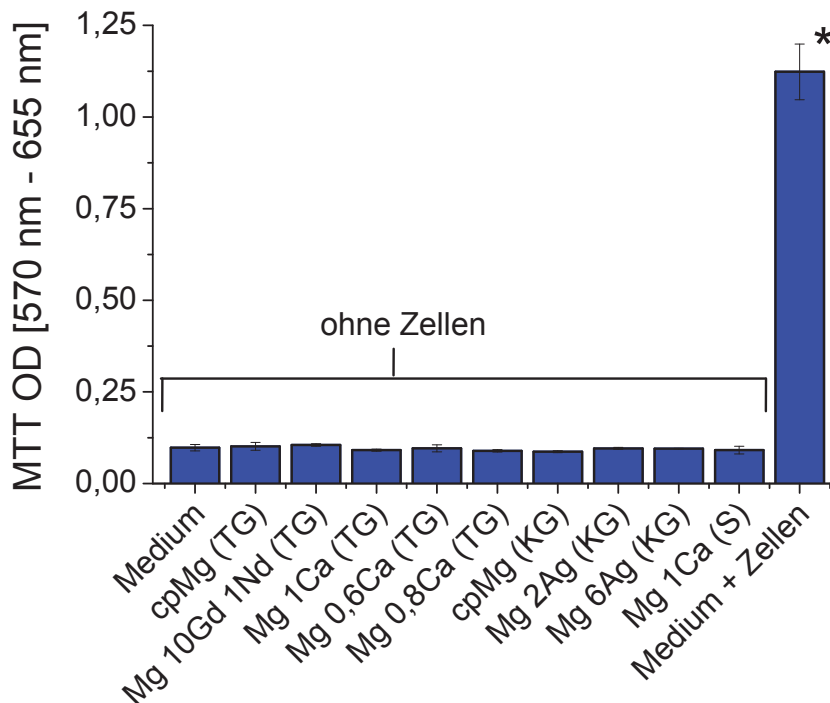


Abbildung 13: Ergebnisse des MTT-Assays mit dem Zusatzschritt der Medienerneuerung vor der Tetrazoliumzugabe. Dargestellt ist die gemessene optische Dichte für Zellen, Zellkulturmedium und 100%-Extrakte verschiedener Prüfmaterialien. Die Umsetzung des MTT-Farbstoffs Tetrazolium führt zu einer Erhöhung der optischen Dichte. Medium wurde als Negativkontrolle verwendet. \* Signifikante Unterschiede ( $p<0,05$ ) im Vergleich zum Medium sind durch einen Stern gekennzeichnet. ( $n=70$  für Zellen;  $n=2$  je Legierung)

Im weiteren Verlauf der Arbeit wird diese leicht veränderte Form des MTT-Assays „MTT-Assay mit Zusatzschritt“ genannt. Abbildung 13 zeigt, dass die OD-Werte aller gemessenen unverdünnten 100% Extrakte keinen signifikanten Unterschied mehr zu den Werten des Zellkulturmediums zeigten. Für die Ermittlung eines signifikanten Unterschiedes der OD-Werte der Extrakte zum Zellkulturmedium wurden die Daten der 10 Legierungen zusammengefasst analysiert (*ANOVA on ranks*,  $H=120,267$ ,  $df=2$ ,  $P<0,001$ ;  $n=20$  für Extrakte und  $n=70$  für Zellen).

Eine Kreuzreaktion durch das Magnesium, die zu Falsch-Positiv-Ergebnisse führen würde, kann damit ausgeschlossen werden. Zum Vergleich ist die Umsetzung des Farbstoffes durch Zellen dargestellt. Die gewünschte Umsetzung des Farbstoffes führte zu signifikant höheren OD-Werten im Vergleich zum Zellkulturmedium (*ANOVA on ranks*,  $H=120,267$ ,  $df=2$ ,  $P<0,001$ ). Für den Extrakttest kann das MTT-Assay mit Zusatzschritt daher verwendet werden. Vorsicht ist dennoch geboten für den Fall, dass sich Präzipitate bilden. Diese Magnesiumausscheidungen, die sich sichtbar am Boden des Zellkulturwells ablagern, werden beim Medienwechsel nicht entfernt und können zur Bildung von Falsch-Positiv-Ergebnissen führen. Negativkontrollen müssen daher für jedes Prüfmaterial für jede Konzentration mitgemessen werden, um eine Erhöhung der optischen Dichte durch Präzipitate auszuschließen.

### Direkter Kontakttest

Wie beim Extrakttest wurden auch beim Direkten Kontakttest Zellen als Kontrolle mit den Redoxfarbstoffen MTT und XTT inkubiert. Sowohl im MTT- als auch im XTT-Assay konnte die erwartete signifikante Erhöhung der OD-Werte durch Zellen im Vergleich zum Medium (MTT: *ANOVA on ranks*,  $H=42,987$ ,  $df=5$ ,  $P<0,001$ ; XTT: *ANOVA on ranks*,  $H=29,121$ ,  $df=4$ ,  $P<0,001$ ) beobachtet werden (Abbildung 14). Allerdings führte auch die Inkubation von Magnesiumprüfmaterialien mit den Redoxfarbstoffen in Abwesenheit von Zellen zu einer starken Erhöhung der OD-Werte. Beide Tetrazoliumfarbstoffe wurden durch die korrodierenden Magnesiumprüfmaterialien in Abwesenheit von Zellen in Formazan umgewandelt. Magnesiumprüfmaterialien führten damit sowohl im MTT- als auch im XTT-Assay zu Falsch-Positiv-Ergebnissen. Die Grafik zeigt die Prüfmaterialien, die die Assays am stärksten beeinflusst und zu Falsch-Positiv-Ergebnissen geführte haben. Im MTT-Assay waren die gemessenen OD-Werte der Extrakte von cpMg(S), Mg1Ca(S) und Mg6Ag(KG) signifikant erhöht im Vergleich mit den OD-Werten des Kontrollmediums (*ANOVA on ranks*,  $H=42,987$ ,  $(df)=5$ ,  $P<0,001$ ). Im XTT-Assay führte der cpMg(KG)-Extrakt zu signifikant erhöhten OD-Werten im Vergleich zum Kontrollmedium (*ANOVA on ranks*,  $H=29,121$ ,  $df=4$ ,  $P<0,001$ ) (Abbildung 14). Eine Entfernung des Prüfmaterials vor der Zugabe der Redoxfarbstoffe könnte wie beim Extrakttest auch hier eine Lösungsmöglichkeit darstellen. Für die Direkten Kontakttests Variante 2 und 3 werden die Zellen allerdings auf den Prüfmaterialien ausgesät. Bei den Direkten Kontakttests ist es daher nicht möglich, den Kontakt der Redoxfarbstoffe mit den Magnesiumprüfmaterialien zu umgehen. Für die Quantifizierung der Zytotoxizität von verschiedenen Magnesiumprüfmaterialien im direkten Kontakt sind diese beiden Assays daher nicht geeignet.

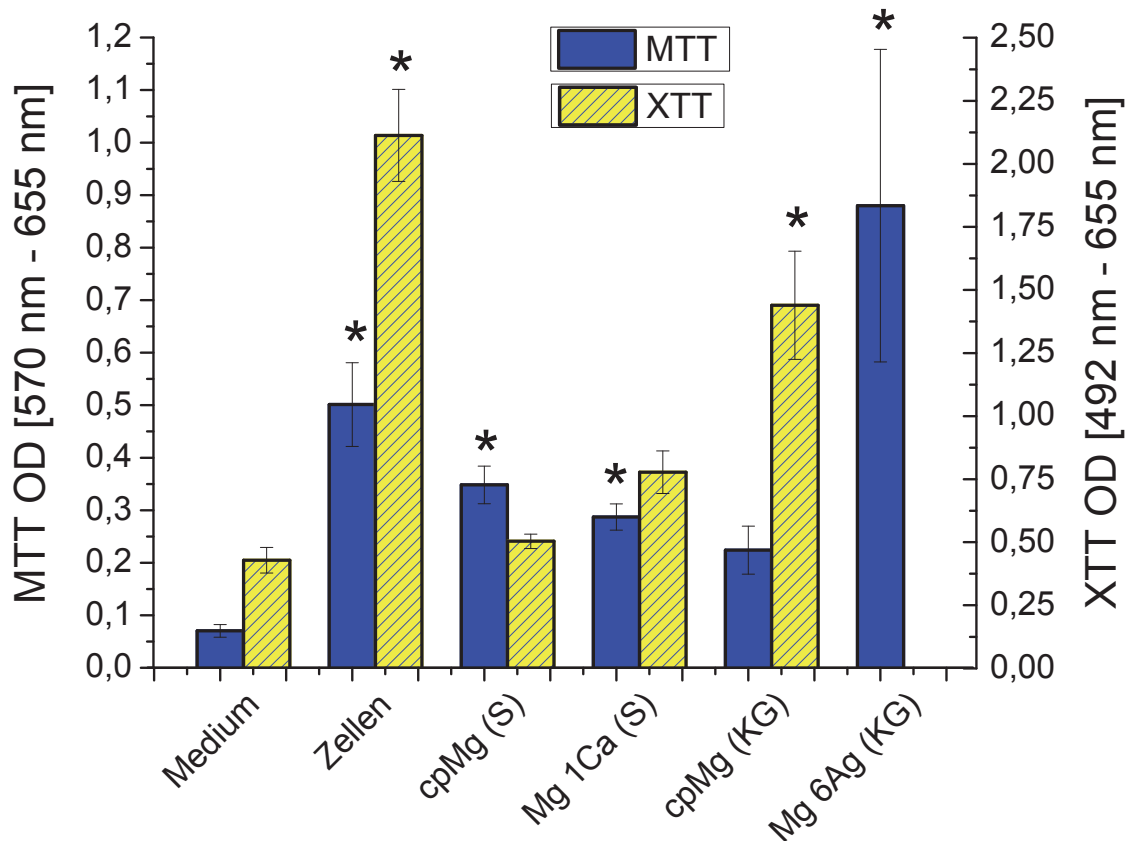


Abbildung 14: Die Grafik zeigt die im MTT- und XTT-Assay gemessene optische Dichte für Zellkulturmedium, Zellen und reine Magnesiumprüfmaterialien. Gezeigt werden die vier Prüfmaterialien, die in Abwesenheit von Zellen zur stärksten Beeinflussung geführt haben. Zum Vergleich ist die Umsetzung des Farbstoffs durch Zellen dargestellt, um das Normalverfahren zu zeigen. Medium wurde als Negativkontrolle verwendet.\* Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu Medium sind durch einen Stern gekennzeichnet. (MTT:  $n=5$  für cpMg(S) und Mg1Ca(S);  $n=7$  für cpMg(KG);  $n=3$  für Mg6Ag(KG);  $n=12$  für Zellen; XTT:  $n=3$  für cpMg(S) und Mg1Ca(S);  $n=7$  für cpMg(KG);  $n=5$  für Zellen)

#### 4.1.2 Einfluss von pH-Wert, Osmolalität und Magnesiumkonzentration

Die Inkubation der Tetrazolium-Farbstoffe mit Extrakten der Magnesiumprüfmaterialien führte zu einer Umsetzung dieser Redoxfarbstoffe und damit zu Falsch-Positiv-Ergebnissen. Bei direktem Kontakt der Prüfmaterialien mit den Farbstoffen war diese Umsetzung sogar noch um ein vielfaches stärker. Um den Grund für dieses Umsetzungspotential zu ermitteln, wurden die Tetrazolium-Farbstoffe verschiedenen hohen alkalischen pH-Werten, erhöhten Magnesiumkonzentrationen und damit erhöhten Osmolalitäten ausgesetzt. Für die Erstellung der pH-Wertlösungen wurde Zellkulturmedium mit Hilfe einer NaOH-Lösung auf pH-Werte von 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 und 10,0 eingestellt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten, dass eine Erhöhung des pH-Wertes zu einer Umsetzung der Farbstoffe und damit zu einer Erhöhung der optischen Dichte führte.

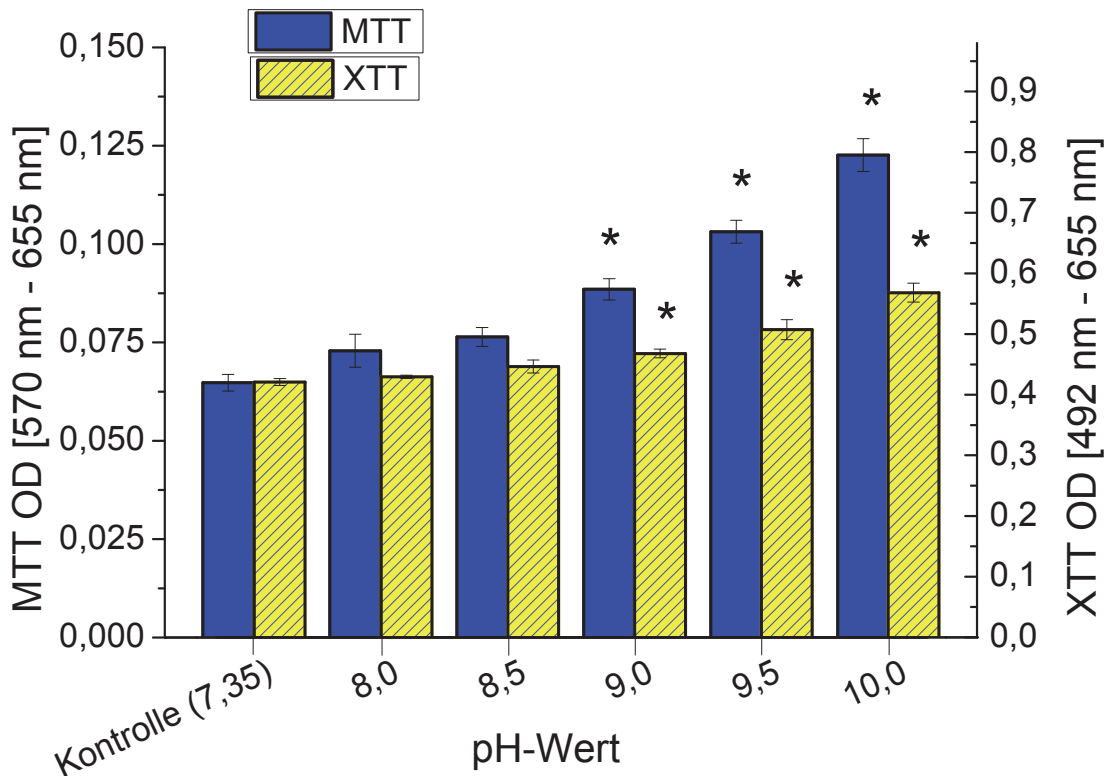


Abbildung 15: Die Grafik zeigt die im MTT- und XTT-Assay gemessene optische Dichte für unbehandeltes Zellkulturmedium (Kontrolle) und Zellkulturmedium mit verschieden hoch eingestellten pH-Werten. Unbehandeltes Zellkulturmedium mit einem pH-Wert von 7,35 wurde als Negativkontrolle verwendet. \* Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zum Kontrollmedium sind durch einen Stern gekennzeichnet. ( $n=8$  je Bedingung)

Diese vermehrte Umsetzung des MTT- und XTT-Farbstoffes geschah ohne die Anwesenheit von metabolisch aktiven Zellen, für deren spezifischen Nachweis diese Assay-Systeme eigentlich konzipiert sind. Ein stark alkalischer pH-Wert  $\geq 9,0$  führte sowohl beim MTT- als auch beim XTT-Assay zu einer signifikanten Erhöhung der optischen Dichte (MTT: ANOVA on ranks,  $H=45,199$ ,  $df=5$ ,  $P < 0,001$ ; XTT: ANOVA on ranks,  $H=44,916$ ,  $df=5$ ,  $P < 0,001$ ) (Abbildung 15). In dem für die Zellen physiologischen Bereich (pH 7-8) wurde kein signifikanter Anstieg gemessen.

Um die Beeinflussung durch eine erhöhte Osmolalität und erhöhte Magnesiumionenkonzentration zu messen, wurde Magnesium in Form von  $MgCl_2$  bis zu einer maximalen Konzentration von 50 mM getestet.  $MgCl_2$  wurde gewählt, da dieses Salz im Rahmen der Korrosion von Magnesium in Zellkulturlösung als häufig gebildetes Korrosionsprodukt entsteht. Für die Erstellung des  $MgCl_2$ -angereicherten Zellkulturmediums wurden die gleichen Medienlösungen verwendet, die auch für die Bestimmung der LD50 von  $MgCl_2$  verwendet wurden (Herstellung siehe Kapitel 3.5). Die Ergebnisse zeigten für beide Assays eine signifikante Abweichung der optischen Dichte (OD) im Vergleich zum Kontrollmedium (MTT: ANOVA on ranks,  $H=12,891$ ,  $P < 0,001$ ; XTT: ANOVA, Shapiro-Wilk  $P=0,649$ , Equal Variance Test  $P=0,248$ ,  $P < 0,001$ ).

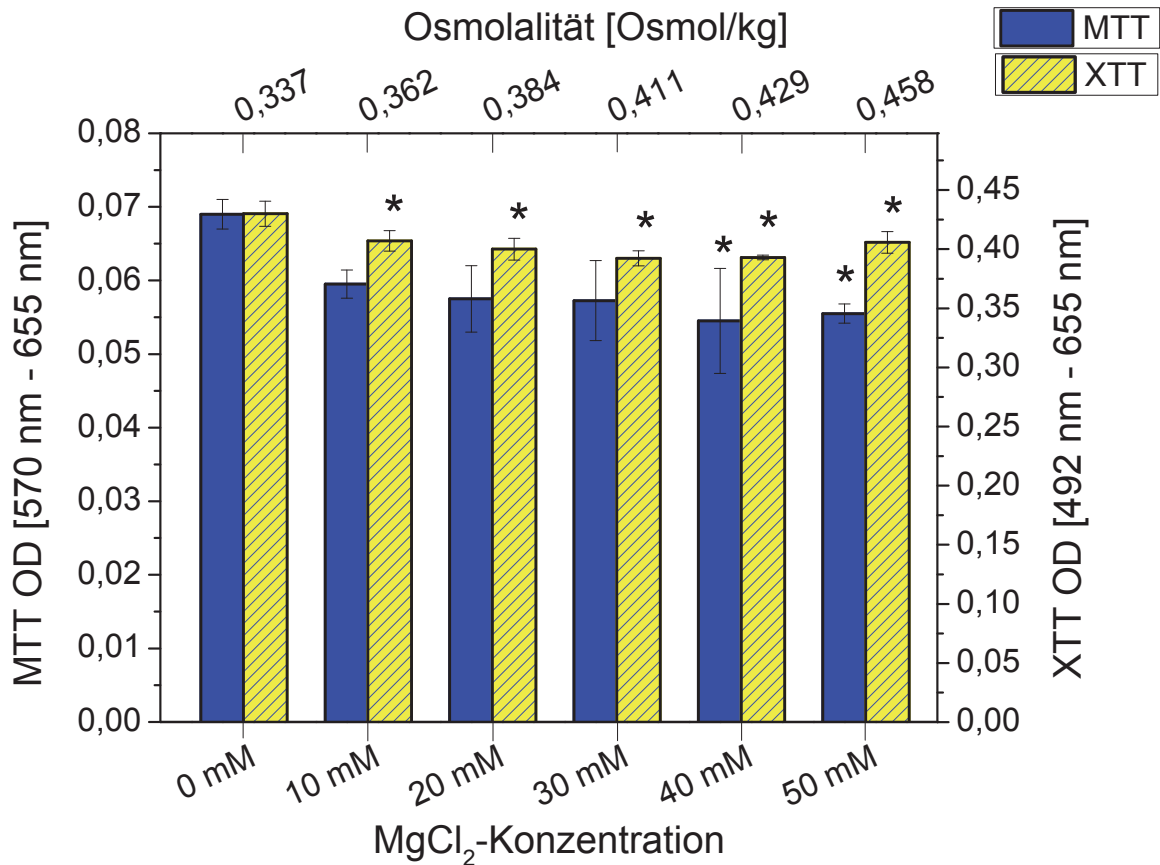


Abbildung 16: Die Grafik zeigt die im MTT- und XTT-Assay gemessene optische Dichte für unbehandeltes Zellkulturmedium (0 mM) und Zellkulturmedium, dem verschiedenen hohen Konzentrationen an MgCl<sub>2</sub> zugefügt wurden. Unbehandeltes Zellkulturmedium wurde als Negativkontrolle verwendet. Zusätzlich zur MgCl<sub>2</sub>-Konzentration ist die Osmolalität der Lösungen angegeben. \* Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) der optischen Dichte im Vergleich zum Kontrollmedium (0 mM) sind durch einen Stern gekennzeichnet. ( $n=4$  je Bedingung)

Allerdings führten die eingesetzten Konzentrationen zu niedrigeren Werten im Vergleich zum Kontrollmedium (Abbildung 16). Das Kontrollmedium stellt die Messung des Blindwertes dar. Bei Werten, die niedriger sind als die des Kontrollmediums, ist daher nicht von einer Beeinflussung auszugehen. Damit konnte sowohl eine erhöhte Osmolalität als auch eine erhöhte Magnesiumkonzentration in Form des Korrosionsproduktes MgCl<sub>2</sub> als Ursache für die Entstehung von Falsch-Positiv-Ergebnissen bei der Verwendung von Tetrazolium-basierten Assay ausgeschlossen werden.

## 4.2 BrdU

Die zweite untersuchte Assay-Art war das chemolumineszente ELISA-basierte BrdU-Assay. Die Anfälligkeit für das Entstehen von Falsch-Positiv-Ergebnissen bei den Tetrazolium-basierten Assays resultierte aus der Reaktionsanfälligkeit der Redoxfarbstoffe. Der quantifizierbare Farbumschlag wird durch Reduktion des verwendeten Farbstoffs erreicht. Um diese Problematik der Redoxfarbstoffe zu umgehen, wurde daher das auf Chemolumineszenz basierende BrdU-Assay für die

## BIOCHEMISCHE ASSAYS

Eignung als Testsystem in diese Untersuchung miteinbezogen. Das BrdU-Assay basiert auf einer über zwei spezifische Antikörper gekoppelten Oxidation eines zugegebenen Substrats und ein alkalisches Milieu, wie es bei der Korrosion von Magnesiummaterialien entstehen kann, ist hierbei sogar von Vorteil.

Als Testextrakt wurde cpMg(KG) eingesetzt, da dieses Prüfmaterial in den Tetrazolium-basierten Assays zu signifikanten Falsch-Positiv-Ergebnissen führte. Es wurde erst ein hochkonzentrierter Extrakt nach ISO 10993:12 hergestellt (100%), der dann mit Zellkulturmedium auf 75%, 50% und 25% verdünnt wurde. Die Grafik in Abbildung 17 zeigt die gemessene Lumineszenz in relativen Lichteinheiten (*relative light units* (RLU)) für Zellen, Extrakte und Zellkulturmedium.

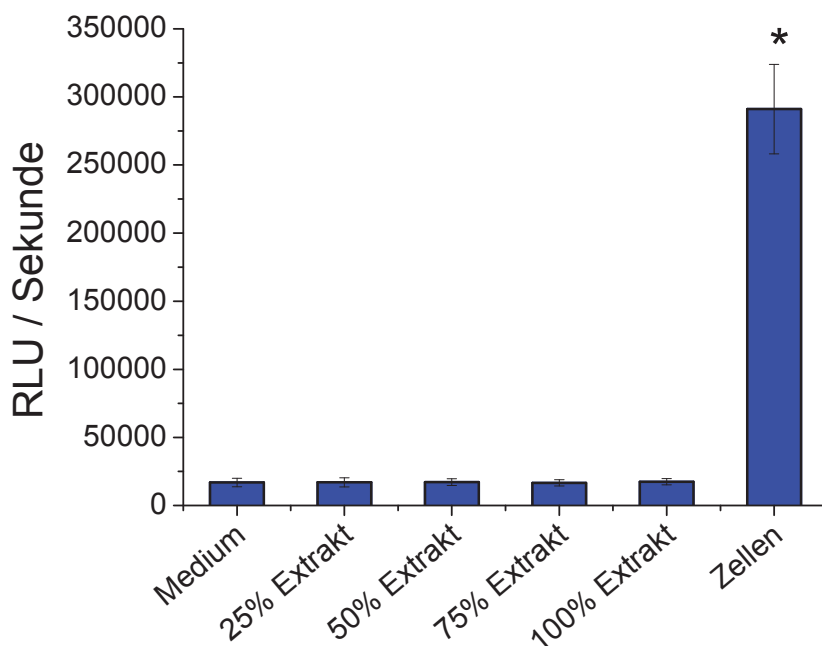


Abbildung 17: Die Grafik zeigt die Ergebnisse des BrdU-Tests mit Reinmagnesium-Extrakten (cpMg(KG)). Die Y-Achse gibt die gemessenen relativen Lichteinheiten an. Medium wurde als Negativkontrolle verwendet. \* Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zum Medium sind durch einen Stern gekennzeichnet. ( $n=8$  für alle Bedingungen)

Das Zellkulturmedium wurde als Negativkontrolle gemessen, Zellen fungierten als Positivkontrolle. Das nach ISO-Norm hergestellte Extrakte wurde unverdünnt (100%) und in drei Verdünnungen (75%, 50%, 25%) in Abwesenheit von Zellen gemessen, um eine mögliche Beeinflussung des Testsystems auszuschließen. Die Grafik zeigt, dass die Zellen zu signifikant höheren Werten führten als die Medienkontrolle (ANOVA on ranks,  $H=11,105$ ,  $df=5$ ,  $P=0,049$ ). Es wurden 15x höhere Werte im Vergleich zum Zellkulturmedium gemessen. Die Werte der Extrakte waren dagegen genauso gering wie die von Zellkulturmedium und wiesen keine signifikante Erhöhung auf (ANOVA,  $P=0,982$ ). Eine Beeinflussung des Tests durch Magnesiumextrakte konnte also nicht gemessen werden.

Das BrdU-Assay wurde nicht im direkten Kontakt mit Magnesiumprüfmaterialien getestet. Die Inkubationszeit der Prüfmaterialien während der Assay-Durchführung ermöglicht eine weitere Korrosion der Prüfmaterialien nach Beenden der 72-stündigen Kultivierungszeit. Dies und die vielen notwendigen Waschschriffe bergen ein Risiko für eine vermehrte Zellablösung und damit einem Verfälschen des Ergebnisses. Daher wurde das BrdU-Assay für die Direkten Kontakttests nicht in Erwägung gezogen.

### 4.3 Vitalfärbung

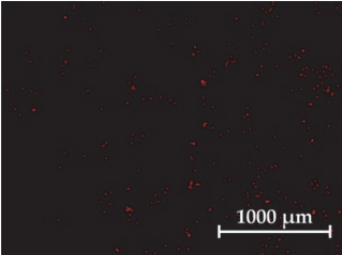
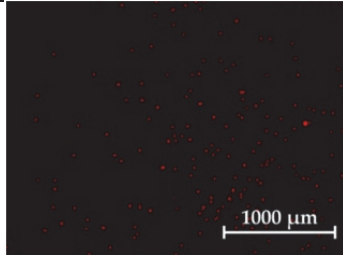
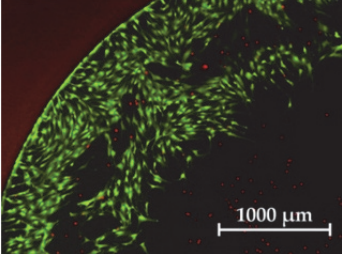
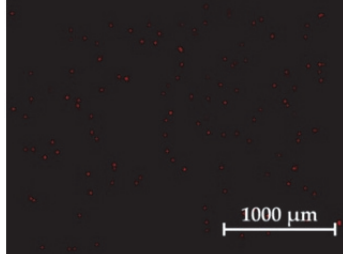
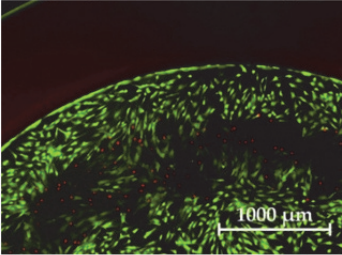
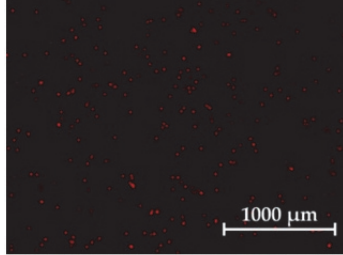
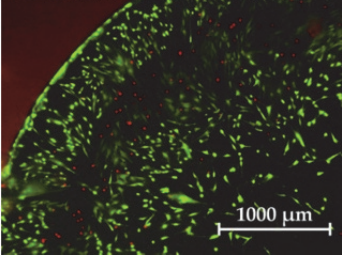
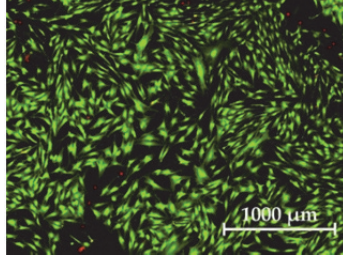
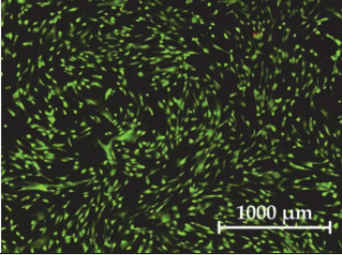
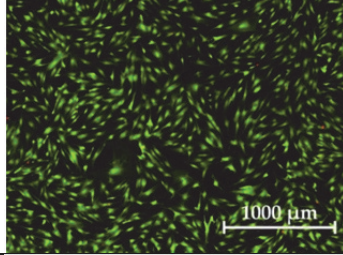
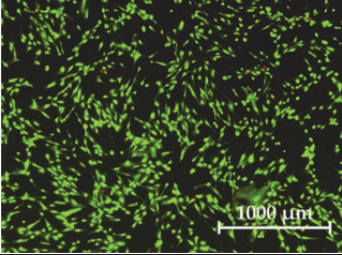
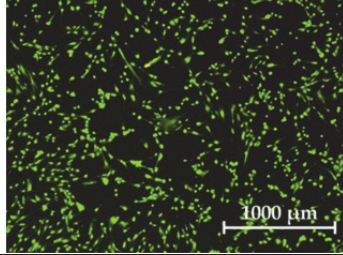
Als dritte Assay-Art wurde eine Vitalfärbung mit Calcein-AM und EthD-1 in die Untersuchung miteinbezogen. Bei der Lebend-Tot-Vitalfärbung nehmen lebende Zellen aktiv den nicht fluoreszierenden Farbstoff Calcein-AM auf und wandeln ihn mittels ubiquitärer Esterase-Aktivität durch enzymatische Abspaltung der Acetoxymethylgruppe in fluoreszierendes Calcein um. Das Calcein ist daraufhin in der Lage Calcium zu binden, wodurch ein grün fluoreszierender Komplex entsteht. Abgestorbene Zellen verfügen nicht mehr über diese Esterasen, so dass nur lebende Zellen spezifisch angefärbt werden.

Tote Zellen werden mit EthD-1 angefärbt. Der rote Farbstoff EthD-1 diffundiert durch die geschädigte und damit durchlässige Zellmembran und bindet an Nukleinsäuren (DNA, RNA). In lebende Zellen kann EthD-1 nicht eindringen. Dies zeigt, dass die Färbung spezifisch für lebende und tote Zellen ist. Dies konnte auch durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden. Die lebenden Zellen waren gut erkennbar grün und die toten rot gefärbt. Dies galt sowohl für alle getesteten unverdünnten 100%-Extrakte als auch für die Prüfmaterialien im direkten Kontakt.

Tabelle 9 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Vitalfärbung im Kontakt mit den verschieden stark verdünnten Extrakten der Prüfmaterialien Mg2Ag(KG) und MG6Ag(KG). Bei diesen beiden Materialien ist der Unterschied zwischen einem schnell (Mg6Ag) und einem langsam (Mg2Ag) degradierenden Prüfmaterial deutlich erkennbar. Bei Mg2Ag reichte eine 2,5-fache Verdünnung (40%) um zytokompatible Ergebnisse (70% Viabilität) zu erreichen, während bei Mg6Ag dieser Zustand erst bei zehnfacher (10%) Verdünnung erreicht wurde. Die Zellen waren klar vom Hintergrund zu unterscheiden. Bei den lebenden Zellen war die gesamte Zelle gefärbt, so dass bei diesen auch der Phänotyp gut erkennbar war. Damit konnte zwischen schlecht adhätierenden sich abkugelnden Zellen und gut adhätierten ausgestreckten Zellen unterschieden werden. Bei den toten Zellen war nur der Zellkern gefärbt. Abbildung 18 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Vitalfärbung von Zellen im direkten Kontakt mit dem Prüfmaterial. Die MG-63-Zellen wurden nach zweistündiger Inkubation auf dem Mg0,6Ca(TG)-Prüfmaterial im Bioreaktor angefärbt. Die lebenden und toten Zellen sowie der Phänotyp der Zellen sind deutlich zu erkennen und vom Hintergrund zu unterscheiden.

# BIOCHEMISCHE ASSAYS

Tabelle 9: Die Tabelle zeigt lebend/tot-gefärbte Osteoblasten nach 72-stündiger Inkubation mit verschieden stark konzentrierten Extrakten der Prüfmaterialien Mg2Ag(KG) und Mg6Ag(KG). Die Fluoreszenzbilder wurden mit einer 4x-Vergrößerung aufgenommen. Die lebenden Zellen sind grün und die toten Zellen rot eingefärbt.

Extraktkonzentration	Mg 2Ag (KG)	Mg 6Ag (KG)
100%		
40%		
20%		
10%		
6,7%		
Kontrolle		

Damit ist die Lebend/Tot-Vitalfärbung sowohl für die Anwendung im Extrakttest als auch für die Direkten Kontakttests geeignet.

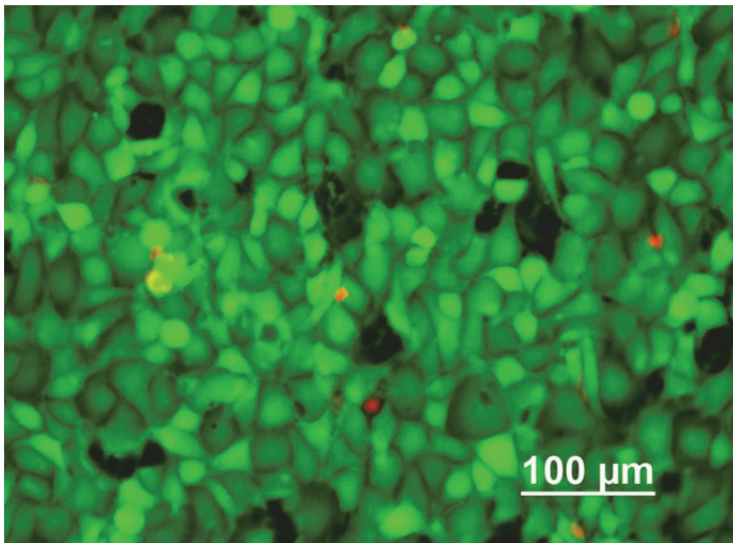


Abbildung 18: Vitalfärbung von MG-63-Zellen auf Mg<sub>0,6</sub>Ca(TG)-Probe nach zweistündiger Inkubation im Bioreaktor. Das Fluoreszenzbild wurde mit einer 20x-Vergrößerung aufgenommen und zeigt grün fluoreszierende lebende Zellen und rot fluoreszierende Zellkerne von toten Zellen.

#### 4.4 Diskussion und abschließende Beurteilung der biochemischen Nachweismethoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die von der ISO-Norm empfohlenen Tetrazolium-basierten Assays MTT und XTT für die Quantifizierung der Zytotoxizität von bioabbaubaren Magnesiummaterialien geeignet sind. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass diese Assay-Art sowohl durch Extrakte der Magnesiumprüfmaterialien als auch durch den direkten Kontakt mit den Magnesiumprüfmaterialien beeinflusst werden kann. Eine ähnliche Problematik wird auch für andere Chemikalien in der Literatur beschrieben. Es finden sich eine Reihe an Chemikalien (Albumin, Thiol-enthaltende Antioxidantien (Beta-Mercaptoethanol, Dithiothreitol, Pyrrolidine-Dithiocarbamate, Acetylcystein), Flavonoide (Luteolin, Quercetin, Rutin), , Glutation S-Transferase), die in der Lage sind, die von der ISO-Norm empfohlenen Tetrazoliumfarbstoffe umzusetzen und so zu Falsch-Positiv-Ergebnissen führen [120-127]. Hierbei werden die Redoxfarbstoffe MTT und XTT in Abwesenheit von Zellen von den jeweiligen Chemikalien umgesetzt. Des Weiteren kann auch die Größe von Partikeln ein Einflussfaktor sein. Monteiro-Riviere beschreibt in einer Publikation, dass Nanopartikel in Abwesenheit von Zellen zur Umsetzung des MTT-Tetrazoliumfarbstoffes führten und das MTT-Assay daher nicht für die Quantifizierung der Zytotoxizität von diesen Nanopartikeln geeignet sei [128]. Die Quantität der Umsetzung von MTT in Formazan ist zudem von verschiedenen weiteren Faktoren abhängig. So beschreibt Vistica in seiner Publikation, dass die MTT-Umsetzung anhängig ist von der vorhandenen D-Glucose-Konzentration im Zellkulturmedium. Zelllinien, die viel D-

Glucose verbraucht hatten, führten zu einer deutlich niedrigeren Formazan-Bildung als Zelllinien, die weniger D-Glucose verbrauchten [125]. Ein Wechsel des Kultivierungsmediums auf ein D-Glucose-freies Medium mit Ersatz-Kohlehydraten führte innerhalb von 24 h sogar zu einer siebenfachen Reduktion der Formazan-Bildung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten außerdem, dass ein alkalischer pH-Wert in der Abwesenheit von Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der optischen Dichte und damit zu Falsch-Positiv-Ergebnissen führte. In der Literatur finden sich Hinweise, die diese Problematik unterstützen. Plumb et al zeigten, dass eine Erhöhung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich zu einer Absorptionsverstärkung des MTT-Tetrazoliumfarbstoffes führte [129]. Im Falle der in dieser Arbeit untersuchten Magnesiumprüfmaterialien führten sowohl die Extrakte der Magnesiumprüfmaterialien als auch die Magnesiumprüfmaterialien selber (direkter Kontakt) zu Falsch-Positiv-Ergebnissen.

Bei beiden Farbstoffen (MTT und XTT) führten alkalische pH-Werte, der Kontakt mit Magnesiummaterial-Extrakten und der direkte Kontakt mit den Magnesiumprüfmaterialien zu einer Erhöhung der gemessenen optischen Dichte. Der Grund für die Bildung der Falsch-Positiv-Ergebnisse ist daher im Reaktionsmechanismus dieser beiden Farbstoffe zu suchen. Die Assays basieren auf einem messbaren Farbumschlag, der anhand der Absorptionserhöhung (optische Dichte) bei der für den jeweiligen Farbstoff zugehörigen Wellenlänge quantifiziert wird. Dieser spezifische Farbumschlag entsteht durch die Reduktion der Farbstoffe. Im Rahmen der Reduktion der Farbstoffe (MTT und XTT) kommt es zu einer Ringöffnung des Tetrazoliums und ein quaternäres Amin wird zu einem tertiären Amin. Ein weiteres tertiäres Amin, welches vorher an das quaternäre Amin gebunden war, bindet daraufhin ein Wasserstoffmolekül, wodurch der Tetrazolium-Farbstoff zu Formazan reduziert und seine Farbe verändert wird [83, 98, 129] (Abbildung 19, Abbildung 20).

Dies beschreibt die Reduktion der Farbstoffe durch metabolisch aktive Zellen. Eine mögliche Erklärung für die Reduktion der Farbstoffe in Abwesenheit von Zellen ist die hohe reduktive Korrosionsumgebung der Magnesiumprüfmaterialien [83]. Magnesium ist ein sehr reaktives Element. Es ist vorstellbar, dass Magnesium in einem stark alkalischen Milieu in der Lage ist die Ringform des Tetrazoliums zu öffnen und sich anstelle des Wasserstoffmoleküls an das tertiäre Amin zu binden. Dieser Chelatkomplex aus Tetrazolium als Ligand und  $Mg^{2+}$  als Zentralatom könnte zu einer Farbveränderung ähnlich der Reaktion mit Zellen führen [83] (Abbildung 19, Abbildung 20).

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass ein Austausch der Extrakte durch frisches Medium kurz vor der MTT-Zugabe zu unbeeinflussten Ergebnissen führte und damit das MTT-Assay für eine Quantifizierung der Zytotoxizität von Magnesiumprüfmaterialien ermöglicht. Für die Quantifizierung der Zytotoxizität im

direkten Kontakt mit Magnesiumprüfmaterialien, bei der die Zellen auf dem Prüfmaterial kultiviert werden, kann dieses Assay allerdings nicht verwendet werden. Der Kontakt zwischen der hohen reduktiven Korrosionsumgebung der Magnesiumprüfmaterialien und dem Farbstoff kann hierbei nicht unterbunden und die Bildung von Falsch-Positiv-Ergebnissen daher nicht vermieden werden.

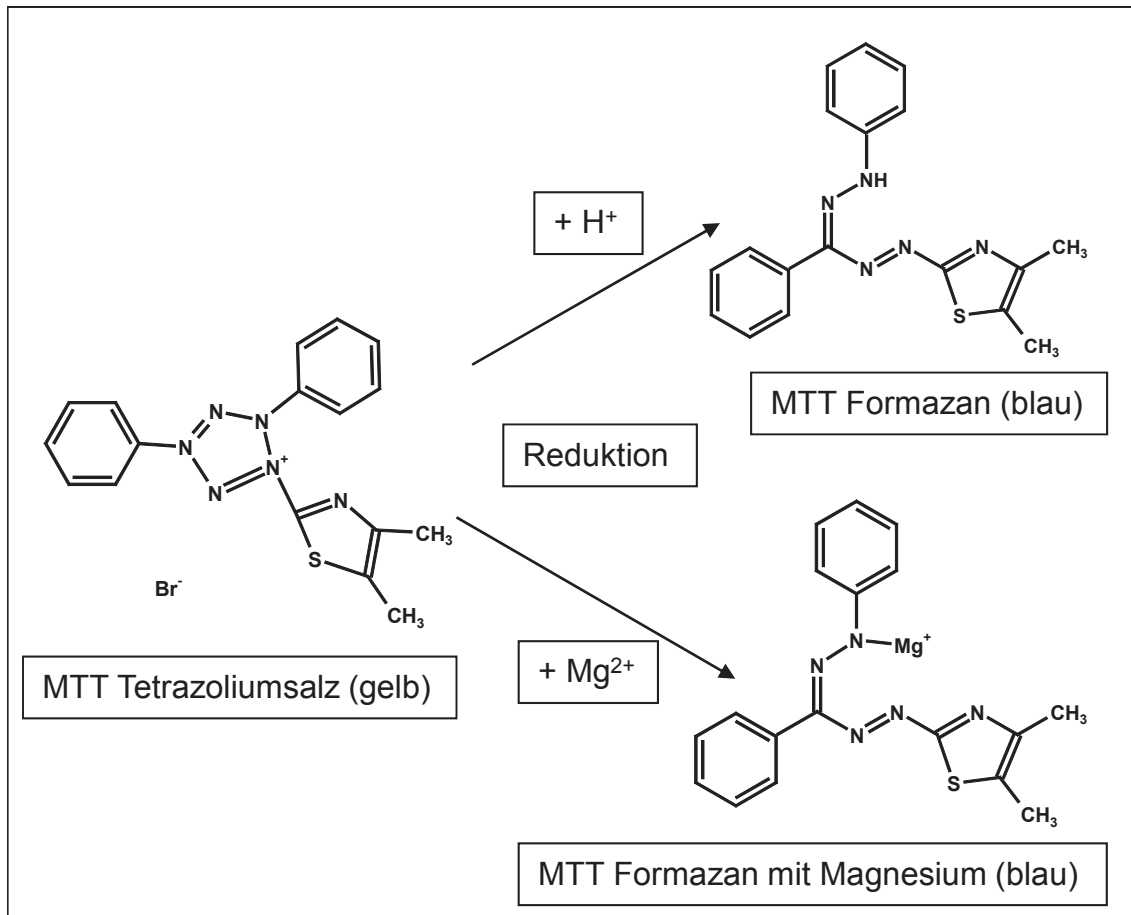


Abbildung 19: Der gelbe Tetrazoliumfarbstoff MTT wird zu blauem Formazan reduziert. Bei einer Reduktion durch Zellen wird ein Wasserstoffmolekül eingebaut, während bei der Reduktion durch Magnesium ein Magnesiumion eingebaut wird.

Das chemolumineszente BrdU-Assay wurde im Extrakttest nicht durch Magnesiumextrakte beeinflusst. Allerdings ist BrdU ein teures und sehr zeitaufwändiges Testverfahren und damit nicht die erste Wahl. Für die Direkten Kontakttests Variante 2 und 3 ist BrdU aufgrund der vielen Waschschrte und langen Inkubationszeiten in verschiedensten wässrigen Lösungen ungeeignet. Durch die vielen Waschschrte droht eine vermehrte Ablösung von Zellen. Durch die langen Inkubationszeiten der Prüfmaterialien in verschiedenen nicht-testspezifischen (kein Zellkulturmedium) Medien, korrodieren die Magnesiumprüfmaterialien weiterhin unkontrolliert vor sich hin, was zu einer zusätzlichen Ablösung von Zellen führen kann. Somit können die Prüfmaterialien nur noch schwer miteinander verglichen werden.

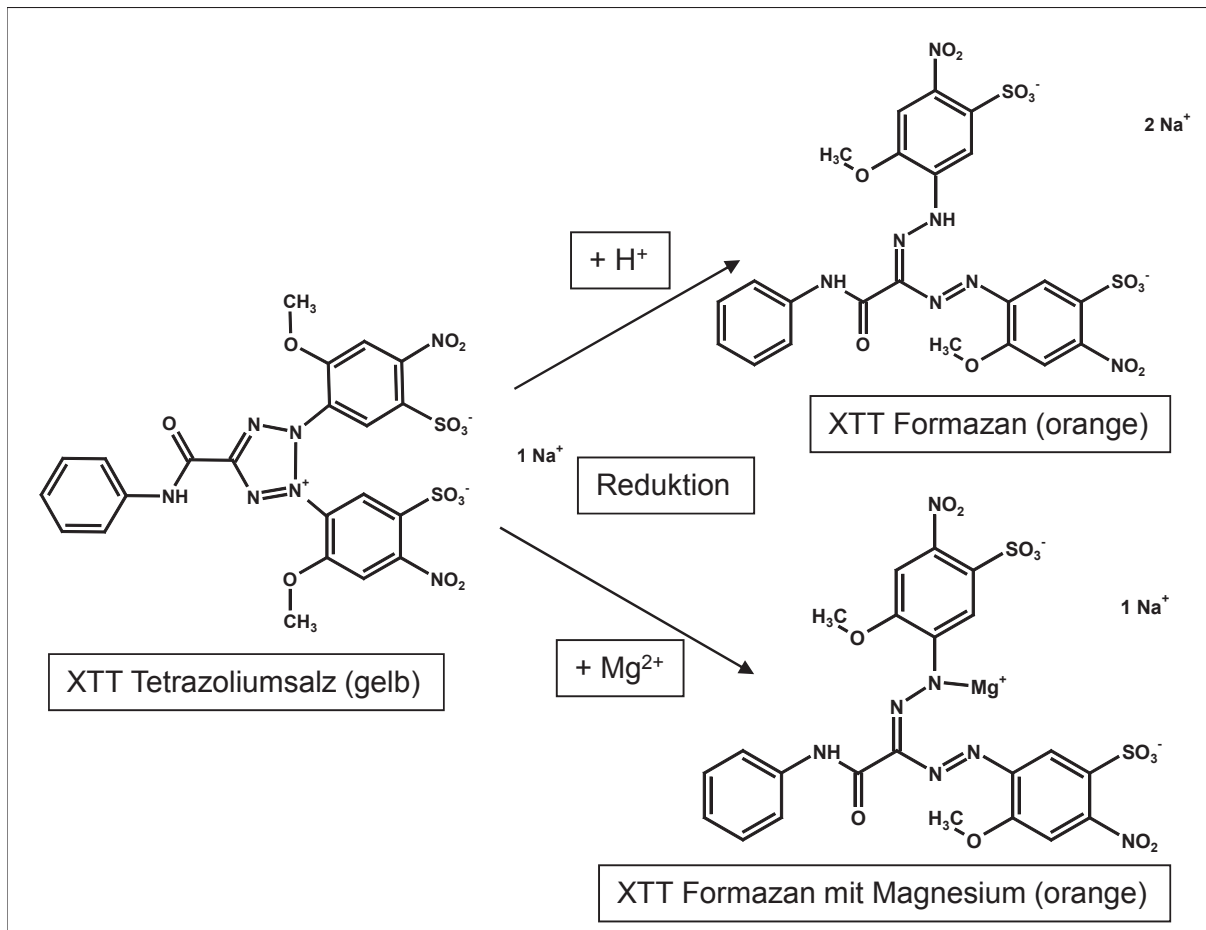


Abbildung 20: Der gelbe Tetrazoliumfarbstoff XTT wird zu orangenem Formazan reduziert. Bei einer Reduktion durch Zellen wird ein Wasserstoffmolekül eingebaut, während bei der Reduktion durch Magnesium ein Magnesiumion eingebaut wird.

Die Lebend/Tot-Vitalfärbung führte im direkten Kontakt und im Kontakt mit Extrakten zu zuverlässigen Ergebnissen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Lebend/Tot-Vitalfärbung weder durch Magnesiumextrakte noch im direkten Kontakt mit den Magnesiumprüfmaterialien beeinflusst wurde. Die einzelnen lebenden und toten Zellen waren deutlich zu erkennen und konnten problemlos ausgezählt werden. Eine Anfärbung der Magnesiumprüfmaterialien konnte nicht beobachtet werden. Allerdings ist diese Methode sehr zeitaufwändig und teurer als die Tetrazolium-basierten Assays und daher nicht erste Wahl. Für die Testung von Magnesiumlegierungen im direkten Kontakt ist dieses Assay der einzig zuverlässige und wurde daher im weiteren Verlauf dieser Arbeit für die Direkten Kontakttests mit Magnesiumprüfmaterialien verwendet (siehe Kapitel 6) (Tabelle 10).

Ein weiterer Vorteil der Lebend/Tot-Färbung gegenüber den Tetrazolium-basierten Assays ist die Möglichkeit der Unterscheidung von Zytotoxizität (Zelltod) und zytostatischen Effekten (geringere Wachstumsrate). Die Färbung ermöglicht eine Quantifizierung der Anzahl an toten und lebenden Zellen. Mit Tetrazolium-basierten Assays können keine toten Zellen gemessen werden [98] und eine Unterscheidung von Zytotoxizität und zytostatischen Effekten ist daher nicht möglich [121]. Daher wurde im weiteren Verlauf der Arbeit sowohl die Eignung des MTT-Assays mit

Zusatzschritt als auch die Eignung der Vitalfärbung für die Anwendung im Extrakttest untersucht (siehe Kapitel 5). Tabelle 10 zeigt zusammengefasst, welche Assays für welche Kontaktart am besten geeignet sind, um die Zytotoxizität von Magnesiumprüfmaterialien zu quantifizieren.

*Tabelle 10: Eignung der biochemischen Assays für den Extrakt- und Direkten Kontakttest.*

Test		Geeignet für	
		Extrakttest	Direkter Kontakttest
Tetrazolium-basierte Assays (MTT, XTT)		✗	✗
	+ Zusatzschritt: Erneuerung der Medien vor Zugabe des Tetrazoliums Salzes	✓	✗
Bromdesoxyuridin (BrdU)		✓	✗
Lebend/Tot – Vitalfärbung		✓	✓



## **5 EXTRAKTTESTS NACH ISO-NORM FÜR DIE ERMITTLUNG DER ZYTOTOXIZITÄT VON MAGNESIUMMATERIALIEN IN VITRO (EIGNUNGS- UND PROBLEMANALYSE UND LÖSUNGSMÖGLICHKEITEN)**

In diesem Versuchsteil sollte analysiert werden, ob der Extrakttest nach ISO-Norm grundsätzlich für die Prüfung der Zytotoxizität von Magnesium-Implantatmaterialien geeignet ist. Die ISO-Norm empfiehlt für die Quantifizierung der Zytotoxizität die Tetrazolium-basierten Assays MTT und XTT. Allerdings werden mit diesen Assays keine toten Zellen erfasst und eine Unterscheidung zwischen Zytotoxizität (Zelltod) und zytostatischen Effekten (geringere Wachstumsrate) ist daher nicht möglich. Zur quantitativen Ermittlung der Zytotoxizität wurde daher für die Eignungsanalyse des Extrakttest im Rahmen dieser Arbeit neben dem MTT-Assay (mit Zusatzschritt) auch eine Lebend/Tot-Vitalfärbung hinsichtlich seiner Eignung untersucht. Die Vitalfärbung hat den Vorteil, dass auch die toten Zellen erfasst und quantifiziert werden können und damit eine Unterscheidung zwischen Zytotoxizität und zytostatischen Effekten möglich ist. Das MTT-Assay ist dagegen schneller, günstiger und einfacher in der Anwendung. Für den Fall, dass beide Testsysteme zu einem vergleichbaren Ergebnis der Zytotoxizität führen, könnte in zukünftigen Arbeiten primär das MTT-Assay verwendet und damit Kosten und Personalaufwand gesenkt werden.

Des Weiteren empfiehlt die ISO-Norm für den Extrakttest die Verwendung von Zelllinien. Diese bieten den Vorteil der besseren Vergleichbarkeit von Forschungsergebnissen, der Langlebigkeit, der Stabilität des Genotyps und der meist einfacheren Beschaffungs- und Kultivierungsbedingungen. Primärzellen direkt vom Patienten bieten dagegen den Vorteil, den spenderabhängigen Effekt der Prüfmaterialien untersuchen zu können. Jeder Patient reagiert unterschiedlich auf ein Implantatmaterial. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher auch untersucht, ob die Verwendung von aus pathologischen Geweben gewonnenen Zelllinien ausreichend ist, oder ob sich Unterschiede zu den gesunden direkt vom Patienten gewonnenen Primärzellen (Osteoblasten) zeigen, mit denen das Implantatmaterial später im Patienten wirklich in Kontakt sein wird.

Der nach ISO-Norm hergestellte Extrakt wird im weiteren Verlauf 100% Extrakt genannt. Dieser Extrakt wurde zusätzlich in verdünnter Form in den Konzentrationen 40%, 20%, 10%, 6,7% und 5% eingesetzt.

### 5.1 Analyse des Magnesiumgehaltes von Reinmagnesiumextrakt

Für die Untersuchung der Zytotoxizität nach ISO-Norm können beim Extrakttest neben der Verwendung von unverdünnten 100%-Extrakt zusätzlich mit dem Lösungsmittel verdünnte Extrakte eingesetzt werden. Für die Verdünnung der Extrakte können nach ISO-Norm zwei verschiedene Methoden eingesetzt werden. Die erste Methode ist eine direkte serielle Verdünnung mit dem Lösungsmittel. Für den Fall, dass das Lösungsverhalten der Prüfmaterialien limitiert sein könnte, kann die Verdünnung auch durch eine Veränderung des Verhältnisses zwischen Lösungsmittel und Prüfmaterialmenge durchgeführt werden [13]. Bei der Korrosion von Magnesium geht deutlich mehr Prüfmaterial in Lösung als bei permanenten Implantatmaterialien wie Titan. Daher wurden die in dieser Arbeit verwendeten verschieden stark konzentrierten Extrakte nicht durch eine nachträgliche Verdünnung eines stark konzentrierten 100%-Extraktes hergestellt, sondern wurden einzeln für die jeweilige Konzentration angefertigt. Um eine verdünnte Extraktkonzentration zu erreichen wurde im Verhältnis zur Prüfmaterialmenge die eingesetzte Menge an Lösungsmittel erhöht. Um herauszufinden, ob das Lösungsverhalten unterschiedlich ist im Vergleich zu einer seriellen Verdünnung, wurden diese Extrakte mittels Quadrupol Massenspektrometer (ICP-MS) hinsichtlich ihres Magnesiumgehaltes analysiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass der nach ISO Norm hergestellte 100%-Reinmagnesiumextrakt 118 Mal mehr Magnesium enthielt als das reine Lösungsmittel (Zellkulturmedium mit 10% Serum) (Abbildung 21). Für die Herstellung von weniger konzentrierten Extrakten wurde in dieser Arbeit eine größere Menge Lösungsmittel pro Prüfmaterialmenge inkubiert. Die Ergebnisse zeigten, dass bei der Verwendung von mehr Lösungsmittel im Verhältnis zur Prüfmaterialmenge, der Magnesiumgehalt in den Extrakten wie erwartet sank (Abbildung 21). Allerdings war der Abfall des Magnesiumgehaltes nicht vergleichbar mit Werten, die entstehen würden, wenn der 100%-Extrakt seriell verdünnt worden wäre. Der 100%-Extrakt wies keinen 2,5-Mal höheren Magnesiumgehalt auf als der 40%-Extrakt, sondern nur 1,5-Mal höher. Eine serielle Verdünnung der 100%-Extraktes hätte daher bei 20%- und 40%-Extrakten zu niedrigeren Magnesiumgehalten geführt (Abbildung 22). Eine Verdünnung der Extrakte im Rahmen der Extrakterstellung durch Veränderung des Lösungsmittel-zu-Prüfmaterialmenge-Verhältnisses ist einer seriellen Verdünnung des 100%-Extraktes vorzuziehen, um das individuelle Lösungsverhalten des jeweiligen Prüfmaterials in die Analyse der Zytotoxizität miteinzubeziehen.

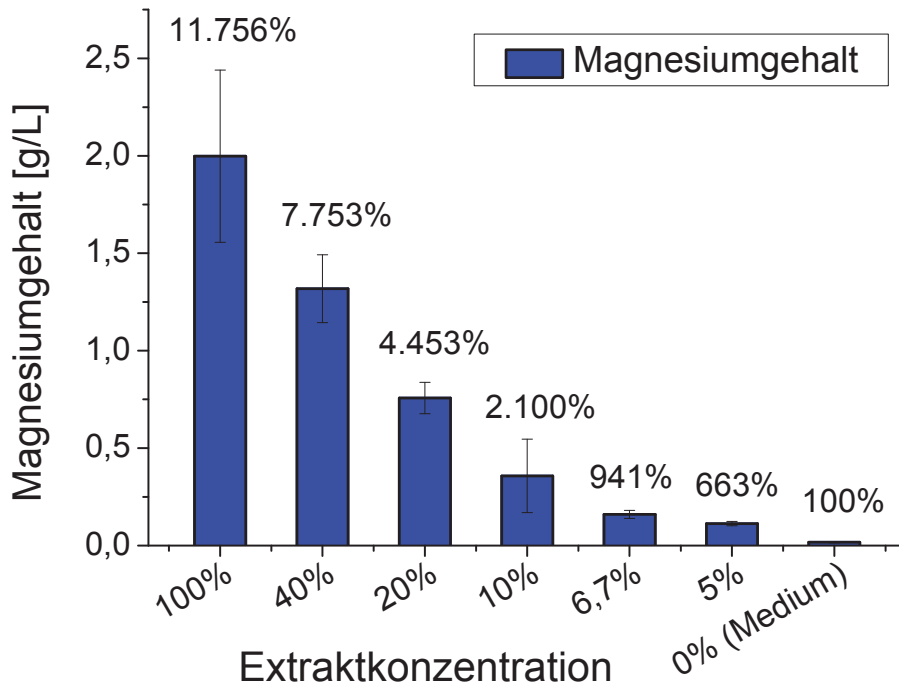


Abbildung 21: Magnesiumgehalt verschieden stark konzentrierter Reilmagnesiumextrakte, gemessen mit ICP-MS. Als Negativkontrolle wurde das reine Zellkulturmedium (0%) gemessen, welches für die Extrakterstellung verwendet wurde. Für jede Extraktkonzentration ist das prozentuale Verhältnis zum Kontrollmedium angegeben. (n=6 je Bedingung)

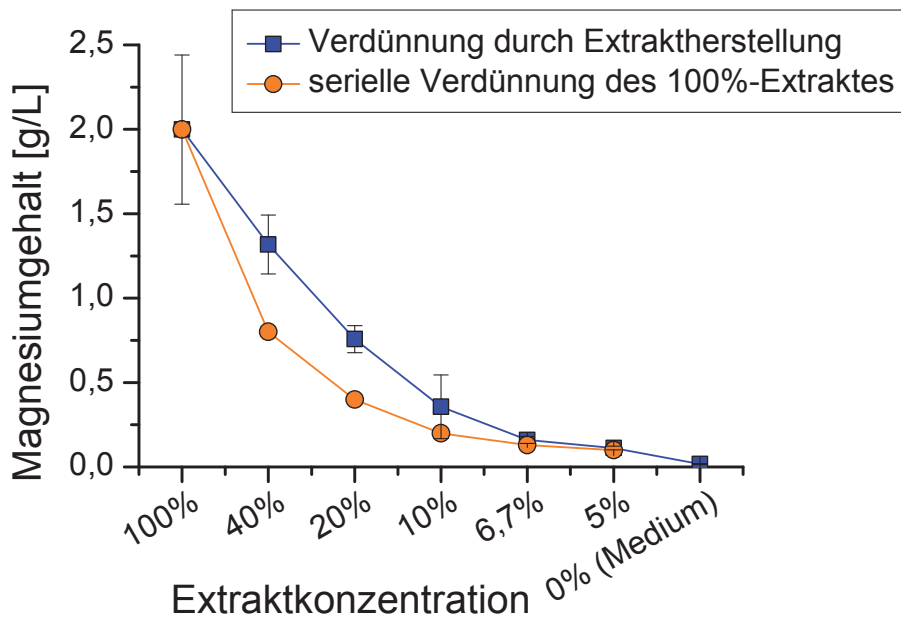


Abbildung 22: Vergleich des Magnesiumgehalts von Extrakten bei Verwendung unterschiedlicher Verdünnungsmethoden. Die mit blauen Quadraten markierten Werte zeigen den mit ICP gemessenen Magnesiumgehalt der Magnesiumextrakte, wie sie im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde (n=6 je Bedingung). Die mit orangenen Kreisen markierten Werte zeigen die theoretischen Magnesiumkonzentrationen, die durch eine nachträgliche direkte Verdünnung des 100%-Extraktes mit Zellkulturmedium entstehen würden.

## 5.2 Ergebnisse der Zytotoxizitätstests (MTT und Lebend/Tot-Vitalfärbung)

### MTT

Die Abbildung 23 A-F zeigen die Ergebnisse des MTT Assays. Die gemessene optische Dichte (OD) der Testzellen (Zellen in Extraktlösung) wurde auf die OD-Werte der Zellkontrolle (Zellen in Zellkulturmedium) normiert und in Prozent dargestellt. Die Osmolalität ist in den Grafiken für jede Konzentration der eingesetzten Extrakte angegeben. Die Zytotoxizitätstests wurden mit Osteoblasten von drei humanen Spendern und der Osteosarkomazelllinie MG-63 in durchgeführt. Bei den Osteoblasten wurde der Mittelwert aus den 3 Spendern dargestellt. Die Toleranzbalken beziehen sich auf 7-14 Parallelansätze je Zelltyp und Spender. Nach ISO 10993-5 wird eine Reduktion der Viabilität um mehr als 30% als zytotoxisch angesehen [13]. Die Linie bei 70% Viabilität zeigt damit den Übergang von zytokompatibel zu zytotoxisch. Die Ergebnisse des MTT-Assays zeigen, dass alle Prüfmaterialien für beiden Zelltypen bei Verwendung des unverdünnten nach ISO-Norm hergestellten 100%-Extraktes zytotoxisch sind. Daher würde keines dieser Prüfmaterialien unter diesen Bedingungen für die Verwendung als Implantatmaterial in Frage kommen. Allerdings schreibt die ISO-Norm hinsichtlich der Auswertung der Zytotoxizitätsdaten keine genauen Grenzen vor. Es ist einem erfahrenen Prüfer überlassen, wie er die Zytotoxizitätsdaten bewertet. Die Zytotoxizitätsdaten sollen als Hilfestellung für die Auswahl geeigneter Prüfmaterialien für *in vivo*-Tests verwendet werden [13]. Die ISO-Norm empfiehlt neben der Verwendung von unverdünnten 100%-Extrakten auch die Anwendung von verdünnten Extrakten. Eine Verdünnung der in dieser Arbeit verwendeten Extrakte führte durchaus zu zytokompatiblen Ergebnissen. Die verdünnten Extrakte führten je nach verwendeten Zelltyp und verwendetem Prüfmaterial bei unterschiedlicher Extraktkonzentrationen zu einem zytokompatiblen Ergebnis. Bei Mg<sub>0,6</sub>Ca(TG) führte z.B. bereits der 2,5-fach verdünnte Extrakt (40%) bei Osteoblasten zu zytokompatiblen Ergebnissen, während bei MG-63-Zellen erst der 5-fach verdünnte Extrakt (20x) zu diesem Ergebnis führt. Im Gegensatz zur Mg<sub>0,6</sub>Ca(TG)-Legierung erreicht die Mg<sub>6</sub>Ag(KG)-Legierung erst bei wesentlich verdünnteren Konzentrationen zytokompatible Ergebnisse. Für Osteoblasten musste der Extrakt mindestens 10-fach (10%) und für MG-63 mindestens 15-fach (6,7%) verdünnt sein. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Prüfmaterialien handelte es sich um unbehandelte Rohmaterialien, die eine wesentlich höhere Abbaurate aufweisen als die im weiteren Verlauf entwickelten behandelten (Strangpressen, Temperaturbehandlung, Beschichtung) Prototypen und Implantate. Daher ist für die Analyse der Zytotoxizität der hier genutzten Rohmaterialien, die Anwendung und Auswertung der verdünnten Extrakte durchaus sinnvoll.

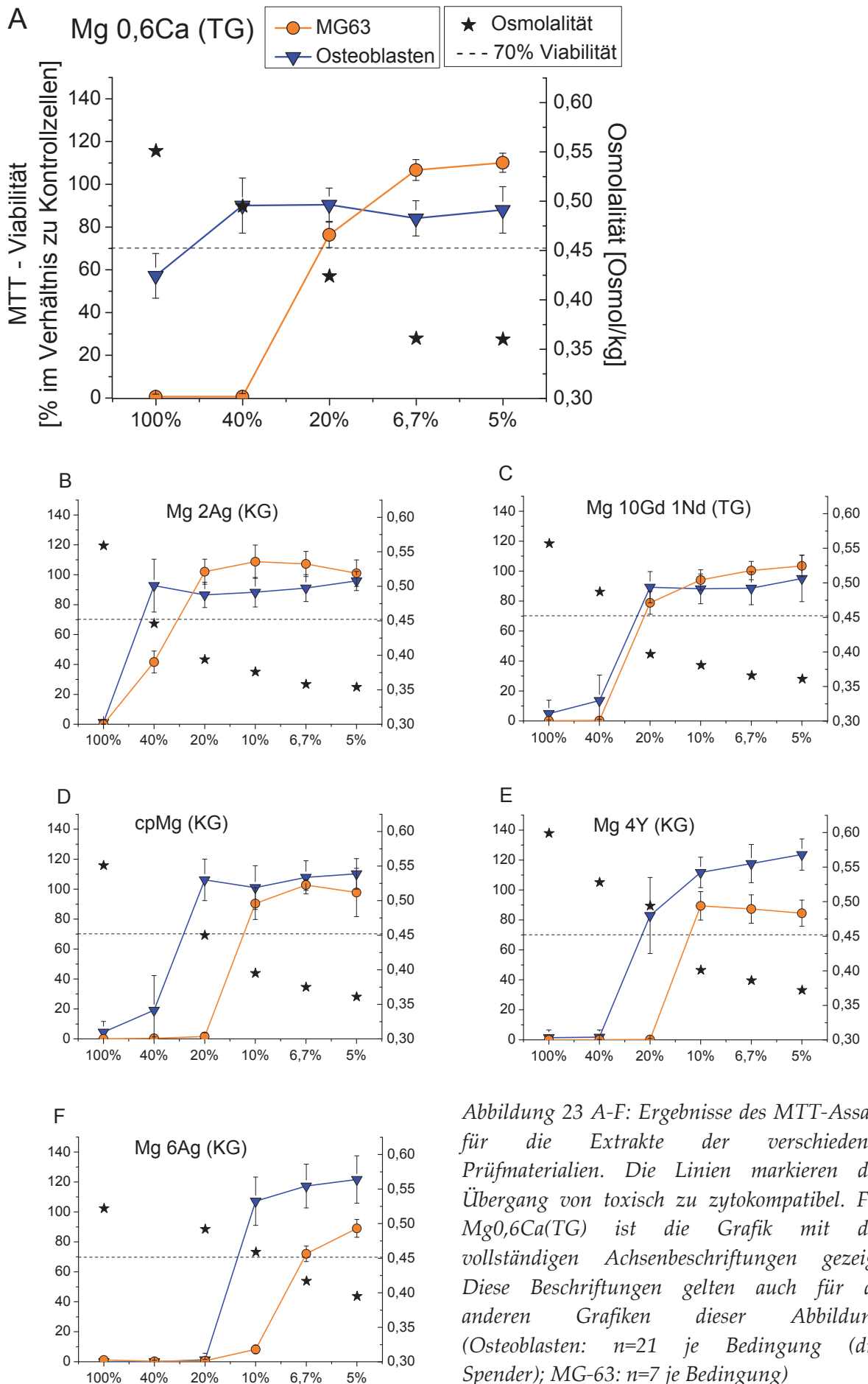


Abbildung 23 A-F: Ergebnisse des MTT-Assays für die Extrakte der verschiedenen Prüfmaterialien. Die Linien markieren den Übergang von toxisch zu zytokompatibel. Für Mg0,6Ca(TG) ist die Grafik mit den vollständigen Achsenbeschriftungen gezeigt. Diese Beschriftungen gelten auch für die anderen Grafiken dieser Abbildung. (Osteoblasten: n=21 je Bedingung (drei Spender); MG-63: n=7 je Bedingung)

## EXTRAKTTEST

---

Zudem entspricht der hier verwendete 2,5-fach verdünnte Extrakt (Lösungsmittel-zu-Prüfmateriale-menge-Verhältnis von 0,2 g/mL) einem unverdünnten Extrakt mit einem Lösungsmittel-zu-Prüfmateriale-menge-Verhältnis von 1,25 cm<sup>2</sup>/mL. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Extrakterstellung das Verhältnis gewählt, das zu einem konzentrierterem Extrakt führt, da somit das 1,25 cm<sup>2</sup>/mL-Verhältnis automatisch miterfasst wird. Prinzipiell können beide Extrakterstellungs-Verhältnisse verwendet werden.

Die höchstmögliche Extraktkonzentration mit zytokompatiblen Ergebnis stellt einen geeigneten Parameter für die Analyse der Zytotoxizität und die Erstellung eines Zytotoxizitäts-Rankings dar. Mit Hilfe dieses Rankings ist es in Folge dann möglich, geeignete Prüfmaterialien für *in vivo*-Tests auszuwählen. Die Ergebnisse dieses Zytotoxizitäts-Rankings sind in Kapitel 5.3 dargestellt. Dies gilt auch für die Ergebnisse der Lebend/Tot-Vitalfärbung.

### Lebend/Tot-Vitalfärbung

Die Zytotoxizitätstests wurden mit Osteoblasten von drei humanen Spendern und der Osteosarkomazelllinie MG-63 in durchgeführt. Bei den Osteoblasten wurde der Mittelwert aus den drei Spendern dargestellt. Toleranzbalken sind nur für Osteoblasten angegeben, da es je Zelltyp und Spender nur einen Ansatz gab.

Für die Darstellung der Ergebnisse der Lebend/Tot-Vitalfärbung wurden zwei verschiedene Auswertemethoden genutzt. Bei der einen Methode wurde die Anzahl der lebenden und toten Zellen erfasst, die Anzahl der lebenden Zellen auf die Gesamtzellzahl normiert und die Viabilität in Prozent dargestellt. Das Ergebnis ist für Osteoblasten (Abbildung 24 A) und MG-63-Zellen (Abbildung 24 C) dargestellt.

Diese im Allgemeinen häufig genutzte Methode birgt allerdings das Risiko, dass die Gesamtzellzahl keine sichere Basis für die Auswertung bietet, wenn nicht alle absterbenden Zellen zuverlässig erfasst werden. Zelltod beinhaltet die beiden Mechanismen Apoptose und Nekrose. Zellen in der frühen Phase der Apoptose besitzen noch keine für den Farbstoff durchlässige Membran und werden daher von EthD-1 nicht eingefärbt [130]. Im Rahmen der Nekrose kommt es zum Zusammenbruch der Zellmembran und das Zellinnere gelangt in das umgebende Medium [131]. Absterbende Zellen können fragmentieren oder sich abkugeln und damit vom Prüfmaterial ablösen. Durch die Waschschrirte beim Färbeprozess werden diese toten Zellen mit dem Entfernen der Lösungen mitentfernt. Bei der Normierung der lebenden Zellen auf die Gesamtzellzahl besteht daher die potentielle Gefahr, dass die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der verschiedenen Prüfmaterialien nicht ausreichend gegeben ist. Daher wurde zusätzlich eine zweite Auswertemethode eingesetzt. Bei dieser zweiten Methode wurde die Anzahl der lebenden Zellen in den Extraktlösungen der Prüfmaterialien auf die Anzahl der lebenden Zellen in der Kontrolllösung (Zellkulturmedium) normiert und im

prozentualen Verhältnis dargestellt. Die toten Zellen wurden hierbei nicht in die Auswertung miteinbezogen. Die Ergebnisse sind für Osteoblasten (Abbildung 24 B) und MG-63-Zellen (Abbildung 24 D) dargestellt. In den Grafiken ist eine Linie eingezeichnet, die die Reduktion der Viabilität um 30% im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigt (Abbildung 24 A-D). Damit markiert sie den von der ISO-Norm deklarierten Übergang von zytokompatibel zu zytotoxisch.

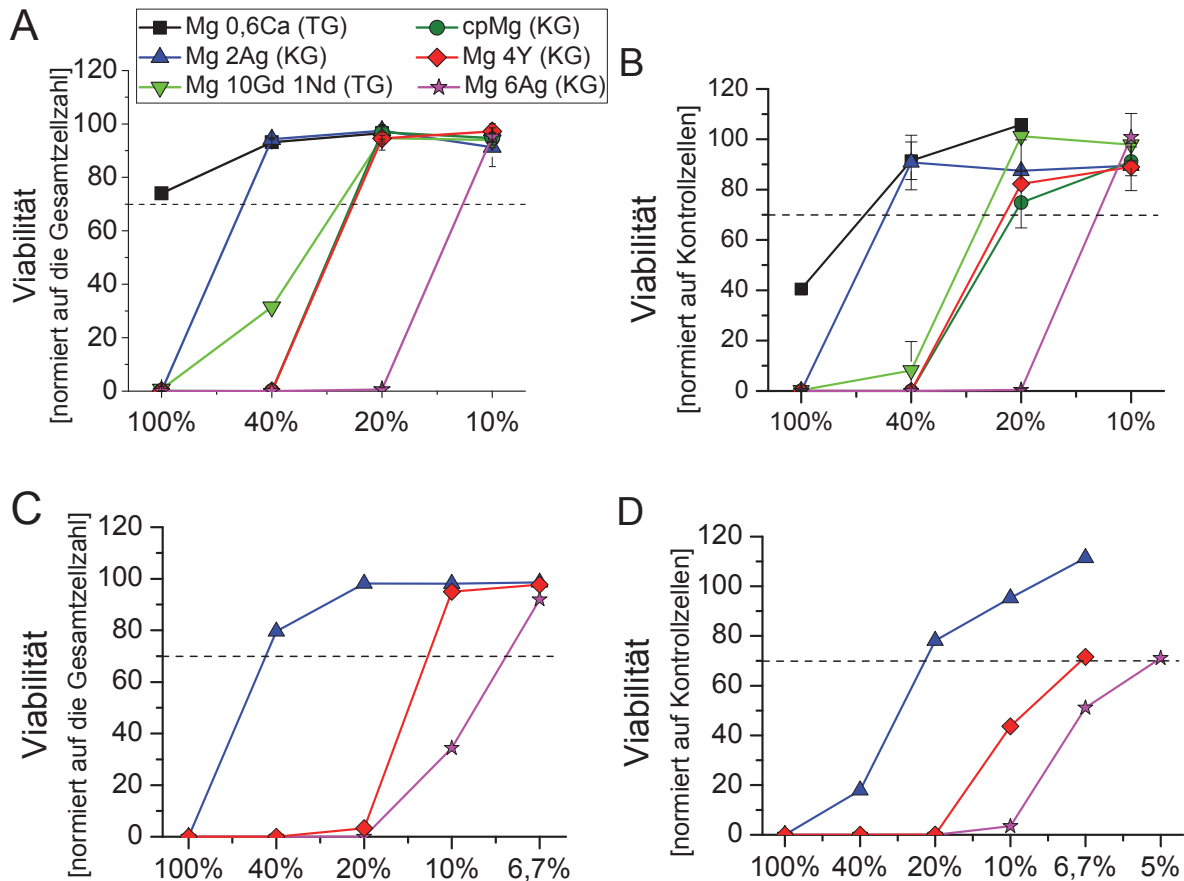


Abbildung 24 A-D: Ergebnisse der Lebend/Tot-Färbung für Osteoblasten (A, B) und MG-63-Zellen (C, D), die in verschieden stark verdünnten Extrakten der Prüfmaterialien inkubiert wurden. Als Kontrolle wurden Zellen in Zellkulturmedium inkubiert. Die Anzahl der lebenden Zellen ist normiert auf die Gesamtzellzahl (A, C) und normiert auf die Anzahl der lebenden Zellen in der Kontrolle (B, D) dargestellt. Die Linie markiert den Punkt, an dem 70% der Zellen viabel sind (A, C), bzw. bei dem die Viabilität der Zellen um 30% reduziert ist im Vergleich zu Kontrollzellen (B, D). Diese Linie markiert damit den Übergang von zytotoxisch nach zytokompatibel. (Osteoblasten: n=3 je Bedingung, da Osteoblasten von Spendern verwendet wurden; MG-63: n=1 je Bedingung)

### 5.3 Ranking der Zytotoxizität der Prüfmaterialien mit Hilfe der ISO-empfohlenen 70%-Viabilitätsgrenze

Für die Erstellung eines Zytotoxizitäts-Rankings wurde für jedes Prüfmaterial die höchste Extraktkonzentration ermittelt, die für die Zellen nicht mehr toxisch war. Das Ergebnis des Zytotoxizitäts-Rankings ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11 zeigt, dass sowohl das MTT-Assay als auch die Lebend/Tot-Vitalfärbung zu einem vergleichbaren Zytotoxizitäts-Ranking führten. Auch die beiden Auswertemethoden bei der Lebend/Tot-Vitalfärbung ergaben ein vergleichbares Ranking. Mg<sub>0,6</sub>Ca(TG) war das Prüfmaterial mit der höchsten Zytokompatibilität und Mg<sub>6</sub>Ag(KG) mit der höchsten Zytotoxizität. Die unverdünnten 100%-Extrakte aller Prüfmaterialien bis auf Mg<sub>0,6</sub>Ca(TG) waren für alle Zellen toxisch.

*Tabelle 11: Die Tabelle zeigt für jedes Prüfmaterial die höchste Extraktkonzentration, die bei Osteoblasten (Osteobl) und MG-63-Zellen noch zu zytokompatiblen Ergebnissen führte. Die Legierungen sind aufsteigend anhand der Zytotoxizität sortiert. Rang 1 zeigt das zytokompatibelste und Rang 6 das zytotoxischste Prüfmaterial.*

Rang	Legierung	Höchste zytokompatible Extraktkonzentration					
		MTT-Assay		Lebend/Tot-Vitalfärbung			
		Metabolisch aktive Zellen normiert auf die Kontrolle		Anzahl lebender Zellen normiert auf die Kontrolle		Anzahl lebender Zellen normiert auf die Gesamtzellzahl	
		MG-63	Osteobl	MG-63	Osteobl	MG-63	Osteobl
1.	Mg 0,6Ca (TG)	20%	40%		40%		100%
2.	Mg 2Ag (KG)	20%	40%	20%	40%	40%	40%
3.	Mg 1Nd 10Gd (TG)	20%	20%		20%		20%
4.	cpMg (KG)	10%	20%		20%		20%
5.	Mg 4Y (KG)	10%	20%	6,7%	20%	10%	20%
6.	Mg 6Ag (KG)	6,7%	10%	5%	10%	6,7%	10%

Der Mg<sub>0,6</sub>Ca(TG)-Extrakt war allerdings in der 100%-Konzentration auch nur für die Lebend/Tot-gefärbten Osteoblasten bei einer Normierung der Anzahl lebender Zellen auf die Gesamtzellzahl zytokompatibel, nicht für die andere Auswertemethode oder das MTT-Assay. In weiterführenden Arbeiten kann daher sowohl das MTT-Assay als auch die Vitalfärbung für Extrakttests genutzt werden. Das MTT-Assay bietet die Möglichkeit schnell, personal- und kostengünstig ein Zytotoxizitäts-Ranking zu erhalten. Hierbei werden allerdings nur die metabolisch aktiven und damit lebenden Zellen erfasst, keine toten Zellen. Mit dem MTT-Assay kann eine Hemmung des Wachstums und der Stoffwechselaktivität gemessen werden, welche laut ISO-Norm geeignete Parameter für die Erfassung der Zytotoxizität sind [13]. Die Vitalfärbung bietet dagegen die Möglichkeit sowohl

zytostatische Effekte (Hemmung des Wachstums) als auch Zelltod (Zytotoxizität) zu erfassen. Die Hemmung des Wachstums kann mit Hilfe einer Normierung der lebenden Zellen auf Kontrollzellen erhalten werden. Die Normierung auf die Gesamtzellzahl bietet die Möglichkeit den Zelltod und damit die Zytotoxizität zu erfassen. Hinsichtlich der Vitalfärbung in Kombination mit der Normierung auf die Gesamtzellzahl sollte allerdings beachtet werden, dass das Risiko besteht, dass die Anzahl der toten Zellen nicht zuverlässig genug erfasst wird, wenn tote Zellen sich ablösen oder sich im frühen Stadium der Apoptose befinden.

Bei allen Prüfmethode für alle Prüfmaterialien vertrugen die Osteoblasten höhere Extraktkonzentrationen als die MG-63-Zellen. Magnesium ist osteokonduktiv, das bedeutet, dass es die Knochenneubildung anregt und unterstützt. Bei der Zelllinie MG-63 handelt es sich um Modellzellen, die aus den Knochenkrebszellen eines einzelnen Spenders generiert wurden. Es besteht die Möglichkeit, dass die direkt vom Patienten isolierten Osteoblasten anders auf Magnesium reagieren als die Zelllinie MG-63. Daher wird in Kapitel 5.4 der Einfluss von erhöhten Magnesiumkonzentrationen auf Osteoblasten und MG-63 näher untersucht.

## **5.4 Untersuchung der Zytotoxizität von Magnesium für die verwendeten Zelltypen**

Die Ergebnisse des Extrakttests (siehe Kapitel 5.2 und 5.3) zeigen, dass die Extrakte von allen Prüfmaterialien für die MG-63-Zellen zytotoxischer waren als für die Osteoblasten. Nur bei Mg10Gd1Nd(TG) war der Extrakt gleich zytotoxisch. Die Osteoblasten tolerierten höher konzentrierte Extrakte und damit auch höhere Magnesiumkonzentrationen als MG-63-Zellen. Die Frage war daher, ob Osteoblasten hohe Magnesiumkonzentrationen besser tolerieren als MG-63-Zellen. Für die Analyse der Zytotoxizität von Magnesium wurde Magnesiumchlorid verwendet, da dieses Salze als Hauptkorrosionsprodukt beim Abbau der Magnesiumprüfmaterialien anfällt. Zudem bleibt der pH-Wert der Testlösungen bei Erhöhung der Magnesiumchlorid-Konzentration physiologisch, so dass ein Zellsterben durch erhöhte pH-Werte ausgeschlossen werden konnte. Es wird nur der Einfluss von erhöhten Magnesiumkonzentrationen erfasst. Der Einfluss der Magnesiumkonzentration auf die Viabilität der beiden Zelltypen wurde mit Hilfe der letale Dosis 50 (LD50) und der 70%-Viabilität bestimmt. LD50 ist die Konzentration, die benötigt wird um 50% der Zellpopulation zu töten. 70%-Viabilität entspricht dem von der ISO-Norm definierten Übergang von zytokompatibel zu zytotoxisch. Für die Durchführung der Untersuchung wurde MgCl<sub>2</sub>-Salz in Zellkulturmedium gelöst und in den Konzentrationen 10 mM bis 100 mM Osteoblasten und MG-63-Zellen für drei Tage zugesetzt. Die Viabilität der Zellen wurde anhand des MTT-Assays (mit Zusatzschritt) ermittelt.

## EXTRAKTTTEST

Die gemessene Werte der optischen Dichte (OD) von den Zellen in den verschiedenen Salzkonzentrationen wurden auf die Kontrollzellen, die nur in Zellkulturmedium ohne Salzzugabe inkubiert wurden, normiert und die Viabilität in Prozent dargestellt (Abbildung 25). Der LD50-Wert für  $\text{MgCl}_2$  wurde für Osteoblasten bei einer Konzentration von 82 mM (Magnesiumkonzentration: 1,97 g/L) erreicht. Bei MG-63 Zellen wurde für den LD50-Wert eine  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration von 38 mM (Magnesiumkonzentration: 0,91 g/L) gemessen. Osteoblasten vertrugen also doppelt so hohe Konzentrationen wie die MG-63 Zellen, was mit den Ergebnissen der Extrakttests korreliert. Eine Reduktion der Viabilität um 30% (70%-Viabilität) wurde für Osteoblasten bei 72 mM (Magnesiumkonzentration: 1,73 g/L) und für MG-63-Zellen bei 24 mM (Magnesiumkonzentration: 0,58 g/L) gemessen.

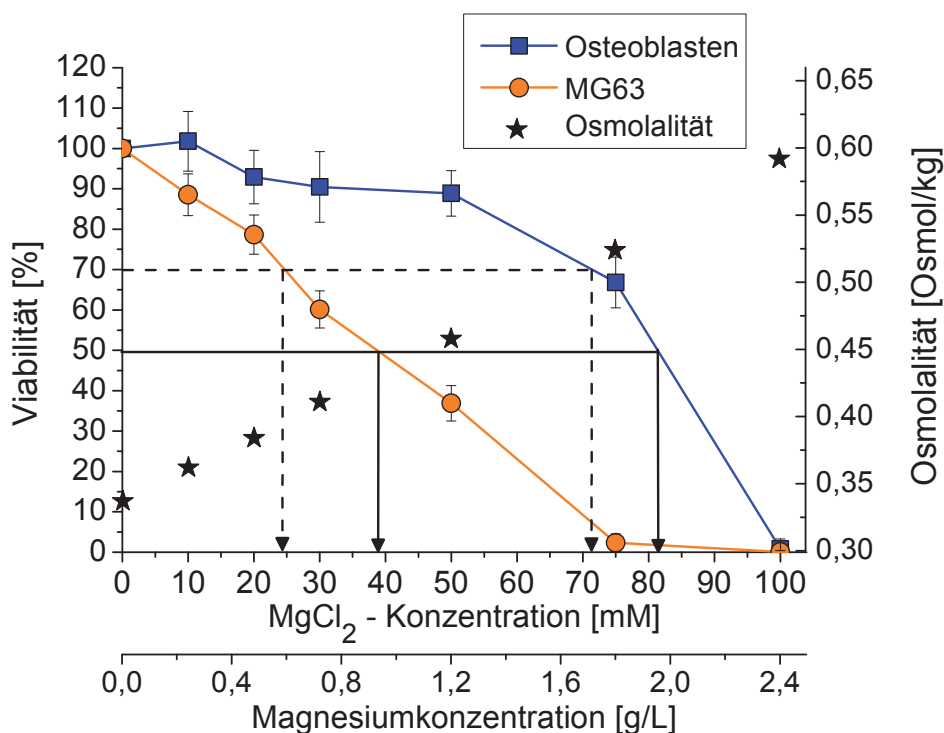


Abbildung 25: Viabilität von Osteoblasten und MG-63 Zellen bei verschiedenen stark konzentrierten  $\text{MgCl}_2$ -Salzkonzentrationen normiert auf die Kontrolle. Als Kontrolle wurden beide Zelltypen in Zellkulturmedium ohne zusätzliche  $\text{MgCl}_2$ -Zugabe (0 mM) inkubiert. Die durchgezogenen Linien geben die letale Dosis 50 (LD50) und die gestrichelten Linien die 70%-Viabilität an. Für die jeweilige  $\text{MgCl}_2$ -Salzlösung sind Osmolalitäten und die errechnete Magnesiumkonzentrationen angegeben. ( $n=14$  je Bedingung und Zelltyp)

Beim Vergleich der Magnesiumgehalte der 10%-igen und 20%-igen Extraktlösungen aus der ICP-MS-Messung (Kapitel 5.1) und den Ergebnissen des Extrakttests (Kapitel 5.2, 5.3) mit den Magnesiumkonzentrationen aus dem  $\text{MgCl}_2$ -Salz-Zytotoxizitätstest zeigte sich eine gute Korrelation. Ein 20%-iger Reinmagnesiumextrakt war im Extrakttest für Osteoblasten zytokompatibel (Viabilität > 70%) und für MG-63-Zellen zytotoxisch (< 70%). Der Magnesiumgehalt eines 20%-Reinmagnesiumextraktes entsprach einer 30 mM- $\text{MgCl}_2$ -Salzlösung (Abbildung 21, Abbildung 25), die bei

Osteoblasten zu einer Viabilität >70% und bei MG-63-Zellen <70% führte. Ein 10%-iger Reinmagnesiumextrakt führte im Extrakttest sowohl bei Osteoblasten als auch bei MG-63-Zellen zu einer Viabilität >70%. Ein Vergleich des Magnesiumgehalts mit MgCl<sub>2</sub>-Salz ergab eine Konzentration von etwa 15 mM (Abbildung 21, Abbildung 25). Eine Salzkonzentration von 20 mM führte sowohl bei Osteoblasten als auch bei MG-63-Zellen zu einer Viabilität >70%.

Die Ergebnisse zeigen damit, dass die Osteoblasten sowohl bei den Magnesiumprüfmaterialien als auch bei MgCl<sub>2</sub> höhere Konzentrationen und damit auch höhere Osmolalitäten tolerieren als die MG-63-Zellen. Es ist daher fraglich, ob eine Zelllinie für die Untersuchung der Zytotoxizität von abbaubaren Magnesiumprüfmaterialien ausreichend ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es sinnvoll wäre, neben einer Zelllinie auch primär isolierte Osteoblasten in die Analyse der Zytotoxizität von Magnesiumprüfmaterialien miteinzubeziehen.

## 5.4 Farbe der Extrakte

Bei der Durchführung der Zytotoxizitäts-Versuche fiel auf, dass die Farbe der Extrakte (Tabelle 12) mit der Zytotoxizität der Extrakte korrelierte. Die Extrakte basieren auf Zellkulturmedium, welches mit dem pH-Indikator Phenol-Rot versetzt wurde. Der in den Extrakten enthaltene Farbstoff Phenol-Rot ist im sauren Bereich pH < 6,8 gelb, bei alkalischen pH-Werten > 8,4 rotviolett und im stark alkalischen Bereich farblos. Im für die Zellen physiologischen Bereich, dem Übergangsbereich von gelb nach rotviolett, ist der Farbstoff hellrot.

Ein Ranking der Zytotoxizität anhand der Farbe der Extrakte führte zum gleichen Ergebnis wie das Zytotoxizitäts-Ranking mittels 75%-Viabilitätsgrenze (Kapitel 5.3). Bei diesem Farben-Ranking wurden die Extrakte von farblos, über rotviolett nach hellrot sortiert. Farblos galt hier als toxisch, rotviolett als weniger toxisch und hellrote Extrakte standen für zytokompatibel. Zur Verbesserung der Vergleichbarkeit des Farben-Rankings mit den Ergebnissen der Zytotoxizität aus Kapitel 5.3 sind die Extrakte in Tabelle 12 hinsichtlich ihrer Zytotoxizitätsergebnisse (Tabelle 11) farblich markiert. Dunkelgrau-markierte Felder stehen für Extrakte, die in allen Zytotoxizitätstests bei beiden Zelltypen zu zytotoxischen Ergebnissen (Viabilität < 75%) führten. Alle diese Extrakte sind farblos. Weiß-markierte Felder stehen für Extrakte, die in allen Zytotoxizitätstests bei beiden Zelltypen zu zytokompatiblen Ergebnissen (Viabilität > 75%) führten. Alle diese Extrakte weisen eine hellrote Farbe wie das Zellkulturmedium oder rotviolette Farbe auf. Hellgrau-markierte Felder stehen für Extrakte, die bei den Zytotoxizitätstests und verschiedenen Zelltypen zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der Zytotoxizität geführt haben. Diese Extrakte waren alle rotviolett.

Bei den hier getesteten Prüfmaterialien konnte von der Farbe des Extraktes auf dessen Zytotoxizität geschlossen werden. Ein farbloser Extrakt war immer

## EXTRAKTTEST

zytotoxisch. Ein hellroter Extrakt war dagegen immer zytokompatibel. Rotviolette Extrakte führten je nach Assay-Art und Zelltyp sowohl zu zytokompatiblen als auch zytotoxischen Ergebnissen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen damit, dass farblose Extrakte zu zytotoxischen Ergebnissen führen und damit von vornherein von der Analyse der Zytotoxizität ausgeschlossen werden können.

*Tabelle 12: Die Tabelle zeigt die Korrelation der Farbe des Indikators Phenol Rot (farblos, rotviolett (RV), hellrot) in den Extrakten mit den Ergebnissen der Zytotoxizitätstests. Die dunkelgrau-markierten Felder stehen für Extrakte, die sowohl im MTT-Assay als auch bei der Lebend/Tot-Färbung bei Osteoblasten und MG-63-Zellen zu zytotoxischen Ergebnissen führten. Diese Extrakte waren alle farblos. Mit weiß-markierte Felder stehen für zytokompatible Ergebnisse. Hellrote Extrakte führten immer zu zytokompatiblen Ergebnissen. Die hellgrau-markierten Felder stehen für Extrakte, die bei den biochemischen Assays oder bei den Zelltypen zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der Zytotoxizität führten.*

Rang	Legierung	100%	40%	20%	10%	6,7%	5%
1.	Mg 0,6Ca (TG)	RV	RV	RV	Hellrot	Hellrot	Hellrot
2	Mg 2Ag (KG)	Farblos	RV	RV	Hellrot	Hellrot	Hellrot
3.	Mg 10Gd 1Nd (TG)	Farblos	Farblos	RV	RV	Hellrot	Hellrot
3.	cpMg (KG)	Farblos	Farblos	RV	RV	Hellrot	Hellrot
4.	Mg 4Y (KG)	Farblos	Farblos	RV	RV	RV	RV
5.	Mg 6Ag (KG)	Farblos	Farblos	Farblos	RV	RV	RV

Die Farbe der Extrakte ist allerdings kein geeigneter Maßstab für den aktuellen pH-Wert, sondern nur für den maximalen pH-Wert, der während der Korrosion im Inkubator erreicht wurde. Eine Messung der pH-Werte der Extrakte mit dem pH-Meter nach der Extraktherstellung außerhalb des Inkubators ergab für alle Extrakte Werte  $< 8,5$ . Die farblosen Extrakte müssten einen wesentlich höheren pH-Wert aufweisen, da die Entfärbung des Indikators Phenol-Rot ein reversibler Vorgang ist und durch die Anbindung von OH-Ionen rückgängig gemacht werden kann. Da der pH-Wert der Extrakte am Ende der Extraktherstellung nicht stark alkalisch war, wie die pH-Messung zeigte, hätte die Extraktfarbe wieder zu Rotviolett wechseln müssen. Es war nicht klar, warum die Extrakte irreversibel farblos blieben. Möglich wäre, dass durch den Korrosionsprozess von Magnesium keine OH-Ionen zur Verfügung standen, da diese bei der Bildung des Degradationsproduktes  $Mg(OH)_2$  gebunden werden. Allerdings wird in Anwesenheit von Chloridionen aus dem  $Mg(OH)_2$  verstärkt  $MgCl_2$  gebildet, so dass OH-Ionen wieder zur Verfügung stehen würden. Eine andere Möglichkeit ist, dass die reaktiven Magnesiumionen den Indikator irreversibel verändert haben könnten. In der Literatur wird diskutiert, dass reaktive Magnesiumionen möglicherweise in der Lage sind, den Farbstoff Tetrazolium zu binden und damit farblich zu verändern [83]. Vielleicht ist dies auch der Fall für den Farbstoff Phenol-Rot.

## 5.5 Osmolalität der Extrakte

Für die Darstellung der Ergebnisse der Zytotoxizitätstests in Kapitel 5.2 ist in der Grafik (Abbildung 23 A-F) zusätzlich zur optischen Dichte bei allen Prüfmaterialeien die Osmolalität der Extrakte für alle eingesetzten Konzentrationen angegeben. Die Grafiken zeigen, dass höher konzentrierte Extrakte eine höhere Osmolalität und eine höhere Toxizität aufwiesen. Um zu ermitteln, ob eine mögliche Korrelation zwischen der Osmolalität und der Toxizität der Extrakte bestand, wurden die Osmolalitäten der in den Zytotoxizitätstests (Kapitel 5.2) verwendeten Extrakte zusammengefasst und daraus die Mittelwerte und Standardabweichungen für jede Extraktkonzentration berechnet. Abbildung 26 zeigt diese aus allen Prüfmaterialeien gemittelten Osmolalitäten für die jeweilige Extraktkonzentration. Als Kontrolle wurde das Lösungsmittel Zellkulturmedium verwendet. Dabei zeigte sich, dass für alle Prüfmaterialeien die Osmolalitätswerte der unverdünnten 100%-Extrakte sowie der verdünnten 40%- und 20%-Extrakte signifikant höher waren als die Werte für die Kontrolle (ANOVA on ranks,  $H=35,346$ ,  $df=6$ ,  $P<0,001$ ). Die Werte der unverdünnten 100%-Extrakte waren dabei sogar 1,6-1,8 Mal so hoch im Vergleich zum Kontrollmedium. Die Osmolalität der 40%-Extrakte für alle Prüfmaterialeien war 1,3-1,6 Mal und die der 20%-Extrakte 1,2-1,5 Mal so hoch wie das Kontrollmedium. Die verdünnten 10%-, 6,7%- und 5%-Extrakte waren nicht signifikant erhöht im Vergleich zum Kontrollmedium.

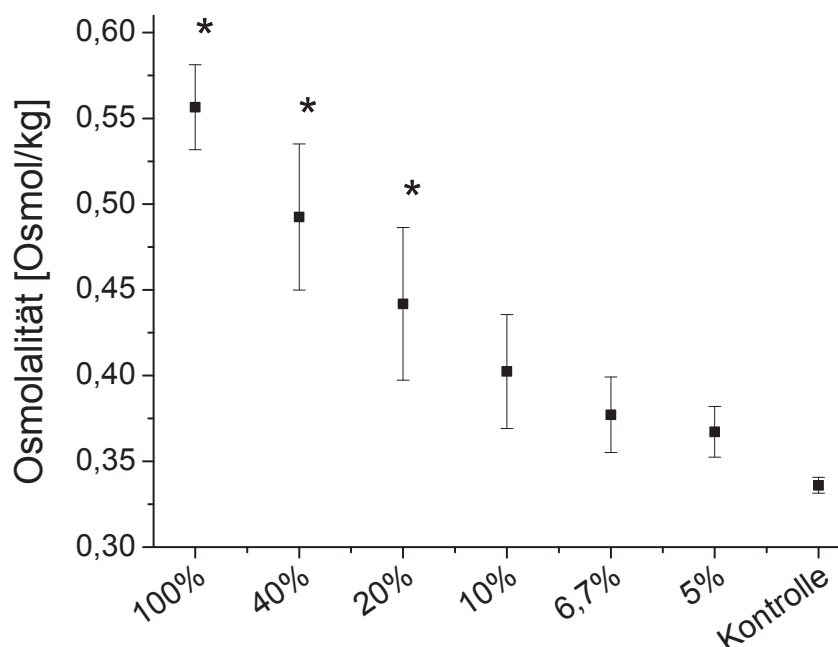


Abbildung 26: Die Grafik zeigt die durchschnittliche Osmolalität der Extrakte, die in den Zytotoxizitätstests (Kapitel 5.2) verwendet wurden. Als Kontrolle wurde das Lösungsmittel Zellkulturmedium verwendet. \* Signifikante Unterschiede ( $p<0,05$ ) im Vergleich zur Kontrolle sind durch einen Stern gekennzeichnet. ( $n=6$  je Bedingung, da Ergebnisse von 6 Legierungen verwendet wurden)

## EXTRAKTTTEST

Hinsichtlich der Zytotoxizität zeigte sich, dass die unverdünnten 100%-Extrakte bis auf der von Mg<sub>0,6</sub>Ca(TG) alle toxisch für alle getesteten Zellen waren (siehe Kapitel 5.2, 5.3). Die Viabilität der Zellen betrug in allen Fällen bis auf bei Mg<sub>0,6</sub>Ca(TG) weniger als 10%. Bei den verdünnten 40%-Extrakten war nur der Extrakt von Mg<sub>2</sub>Ag zusätzlich zu Mg<sub>0,6</sub>Ca(TG) zytokompatibel und das auch nur für die Osteoblasten. Extrakte, deren Osmolalität Werte aufwiesen, die nicht signifikant vom Kontrollmedium abweichen, führten zu zytokompatiblen Ergebnissen. Aufgrund der hohen Osmolalität der hochkonzentrierten Extrakte konnte daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Zellen aufgrund eines osmotischen Schocks starben.

In Tabelle 13 sind die Ergebnisse des Zytotoxizitäts-Rankings dargestellt. Für jedes Extrakt ist die Osmolalität angegeben, um eine Korrelation zwischen Osmolalität und Zytotoxizität zu ermöglichen. Die dunkelgrau-markierten Felder stehen für Extrakte, die sowohl im MTT-Assay als auch bei der Lebend/Tot-Vitalfärbung bei Osteoblasten und MG-63-Zellen zu zytotoxischen Ergebnissen führten. Mit weiß-markierte Felder stehen für zytokompatible Ergebnisse. Die hellgrau-markierten Felder stehen für Extrakte, die bei den biochemischen Assays oder bei den Zelltypen zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der Zytotoxizität führten.

*Tabelle 13: Die Tabelle zeigt das Ranking des Zytotoxizitätstests (Kapitel 5.3). Für jedes Extrakt ist die jeweilige Osmolalität angegeben. Für eine Korrelation mit den Ergebnissen des Zytotoxizitätstests sind die Felder farblich markiert. Die dunkelgrau-markierten Felder stehen für Extrakte, die sowohl im MTT-Assay als auch bei der Lebend/Tot-Vitalfärbung bei Osteoblasten und MG-63-Zellen zu zytotoxischen Ergebnissen führten. Mit weiß-markierte Felder stehen für zytokompatible Ergebnisse. Die hellgrau-markierten Felder stehen für Extrakte, die bei den biochemischen Assays oder bei den Zelltypen zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der Zytotoxizität führten.*

Rang	Legierung	Extraktkonzentration						
		100%	40%	20%	10%	6,5%	5%	KO
1.	Mg 0,6Ca (TG)	0,551	0,495	0,424		0,361	0,36	0,33
2.	Mg 2Ag (KG)	0,559	0,446	0,394	0,376	0,358	0,354	0,339
3.	Mg 1Nd 10Gd (TG)	0,557	0,487	0,397	0,381	0,366	0,361	0,33
4.	cpMg (KG)	0,551		0,45	0,395	0,375	0,361	0,339
5.	Mg 4Y (KG)	0,599	0,528	0,494	0,401	0,386	0,372	0,339
6.	Mg 6Ag (KG)	0,522		0,492	0,459	0,417	0,395	0,339

Bei cpMg(KG), Mg<sub>4</sub>Y(KG) und Mg<sub>6</sub>Ag(KG) korrelieren die Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Tests mit den Osmolalitätswerten. Bei Mg<sub>0,6</sub>Ca(TG), Mg<sub>2</sub>Ag(KG) und Mg<sub>1</sub>Nd<sub>10</sub>Gd(TG) würde ein Ranking anhand der Osmolalität allerdings zu einem anderen Ergebnis führen als das Zytotoxizitäts-Ranking. Der 40%-Extrakt von Mg<sub>0,6</sub>Ca(TG) weist eine höhere Osmolalität auf als die anderen beiden Legierungen. Und beim 100%-Extrakt führt Mg<sub>0,6</sub>Ca(TG)-Extrakt nicht ausschließlich zu zytotoxischen Ergebnissen wie es bei den anderen Legierungen der Fall ist. Und das, obwohl die Osmolalität mit denen der anderen Legierungen vergleichbar ist. Das bedeutet, dass von der Osmolalität eines Extraktes nicht automatisch auf dessen

Zytotoxizität geschlossen werden kann. 100% Mg<sub>0,6</sub>Ca(TG)-Extrakt weist eine deutlich höhere Osmolalität auf als der 100%-und 20%-Extrakt von Mg<sub>6</sub>Ag(KG). Allerdings sind die beiden Mg<sub>6</sub>Ag(KG)-Extrakte für alle Zellen zytotoxisch, während Mg<sub>0,6</sub>Ca(TG) in der Lebend/Tot-Vitalfärbung bei Osteoblasten zu zytokompatiblen Ergebnissen führte. Das bedeutet, dass nicht nur die Osmolalität ein Grund für Zytotoxizität darstellt, sondern dass auch das Legierungselement einen Einfluss hat.

## 5.7 Diskussion und abschließende Beurteilung des Extrakttests

Die ISO-Norm gibt nur grobe Empfehlungen für die Durchführung des Extrakttests um die große Bandbreite an medizinischen Produkten abzudecken. Daher wird nicht ein einzelner Test empfohlen. Stattdessen wird dem Prüfer die Möglichkeit gegeben, schrittweise aus einer Reihe an möglichen Tests und Parametern die für ihn passenden auszuwählen. Die Bedingungen für die Extrakterstellung sollten abhängig von der Kontaktart und -dauer des Prüfmaterials mit dem Patienten getroffen werden. Als Knochen-Implantatmaterial fällt das Prüfmaterial in die Kategorie Implantierbare Medizinprodukte mit längerem (24 h bis 30 Tage) bis dauernden (mehr als 30 Tage) Kontakt mit Knochen und Gewebe [96].

Für die Durchführung der Tests werden die Tetrazolium-basierten Assays MTT und XTT empfohlen. Es können aber auch andere Tests verwendet werden. Zellmetabolismus, Zellwachstum, Zellschädigung und morphologischen Veränderungen können als Parameter für die Bestimmung der Zytotoxizität herangezogen werden. Dabei ist es dem Prüfer überlassen, ob eine quantitative oder qualitative Messung der Zytotoxizität durchgeführt wird. Quantitative Messungen sollten allerdings bevorzugt verwendet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass das MTT-Assay mit Zusatzschritt für die Erstellung eines Zytotoxizitäts-Rankings durchaus geeignet ist. Allerdings werden mit dem MTT-Assay nur die lebenden und metabolisch aktiven Zellen erfasst. Es kann damit nicht zwischen zytostatischen Effekten (Hemmung des Wachstums) und Zytotoxizität (Zelltod) unterschieden werden. Daher wurde in dieser Arbeit zusätzlich die Eignung der Lebend/Tot-Vitalfärbung untersucht. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass mit Hilfe dieser Vitalfärbung zwischen Zelltod und Hemmung des Zellwachstums unterschieden werden kann, da auch die toten Zellen miterfasst werden.

Für den Extrakttest können laut ISO-Norm unverdünnte 100%-Extrakte und zusätzlich auch verdünnte Extrakte verwendet werden. Die Verdünnung der Extrakte sollte in Abhängigkeit vom Löslichkeitsverhalten des Prüfmaterials durchgeführt werden. Empfohlen wird eine serielle Verdünnung. Allerdings kann wenn nötig auch das Lösungsmittelmenge-zu-Prüfmaterialmenge-Verhältnis verändert werden, um eine Verdünnung zu erreichen. In dieser Arbeit wurde für die

## EXTRAKTTTEST

---

Verdünnung der Extrakte das Lösungsmittel-zu-Prüfmaterial-Verhältnis verändert, da durch den Zerfall der Prüfmaterialien hohe Konzentrationen des Prüfmaterials in Lösung gehen. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass dies die geeignetere Verdünnungs-Variante war, da bei einer seriellen Verdünnung deutlich weniger Prüfmaterial in den verdünnten Extrakten gewesen wäre.

Als Testzellen werden von der ISO-Norm Zelllinien empfohlen. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben allerdings gezeigt, dass primär vom Patienten gewonnene Osteoblasten bei allen Prüfmaterialien deutlich höhere Extraktkonzentrationen tolerierten. Des Weiteren tolerierten die Osteoblasten deutlich höhere Osmolalitäten und eine drei Mal höhere  $MgCl_2$ -Konzentration. Magnesium hat einen osteokonduktiven Effekt auf Knochenzellen, das bedeutet, dass es das Knochenwachstum anregt. Für die Analyse der Zytotoxizität von Magnesiumprüfmaterialien sollten daher primär isolierte Osteoblasten neben Zelllinien als Testzellen in Erwägung gezogen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es bei Anwendung der hier gezeigten Testdurchführung möglich ist, die Zytotoxizität von Magnesiumprüfmaterialien anhand des Extrakttests zu quantifizieren. Allerdings sollte der Extrakttest mit Vorsicht angewendet werden. Magnesium gehört zu den Leichtmetallen. Aufgrund der geringen Dichte der Magnesiummaterialien führt das festgelegte Masse-zu-Flüssigkeitsverhältnis bei der Extrakterstellung im Falle des leichten Materials Magnesium dazu, dass im Verhältnis zum Volumen weniger Flüssigkeit benutzt wird. Die Degradation von Magnesium ist ein Oberflächeneffekt. Dadurch, dass mehr Material und damit ein größeres Volumen in Lösung sind, können sehr hohe Magnesiumkonzentrationen und damit entsprechend höhere Osmolalitätswerte entstehen, die für die Zellen nicht mehr physiologisch sind.

Die Osmolalität der höher konzentrierten Extrakte (100%, 40% und 20%) war signifikant höher als die Osmolalität des Kontrollmediums. Hochkonzentrierte nach ISO-Norm hergestellte 100%-Extrakte waren für alle bis auf ein Prüfmaterial toxisch für beide getesteten Zelltypen. Bei den mehr als doppelt verdünnten 40% Extrakten waren vier der sechs Prüfmaterialien für alle Zelltypen toxisch. Die Osmolalität der hochkonzentrierten 100% Extrakte und der verdünnten 40% Extrakte wies sehr hohe Werte von mehr als 0,48 Osmol/kg auf. Osmolalitäten, die den physiologischen Bereich von 0,28-0,3 Osmol/kg übersteigen, führen bei Säugetierzellen zu einem Schrumpfen der Zellen, oxidativem Stress, DNA-Schäden, Verzögerungen im Zellzyklus und letztendlich zu Apoptose [132]. Es ist nicht auszuschließen, dass die Zellen an einem osmotischen Schock statt der Zytotoxizität der Prüfmaterialien starben. Um solche Falsch-Positiv-Ergebnisse auszuschließen, müssen die Extrakte in einer Verdünnung angewendet werden, die für die Zellen mit Sicherheit nicht mehr zu einem osmotischen Schock führen [133].

Diese Problematik der statischen Versuchsdurchführung wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [7, 132]. Ergebnisse aus Tierversuchen zeigen, dass Magnesiummaterialien durchaus biokompatibel sein können und dann sogar zu einem Aufbau von Knochenmaterial führen [8]. Eine einheitliche Festlegung einer geeigneten Osmolalität für den Extrakttest ist notwendig, um diese Prüfmethode zur Ermittlung der Zytotoxizität von Magnesiummaterialien nutzen zu können. Die Extrakte aller zu testenden Prüfmaterialien sollten dabei soweit verdünnt werden bis sie in einem für die Zellen geeigneten physiologischen Osmolalitätsbereich liegen. Die Verdünnung der Extrakte sollte so hoch sein, dass ein Absterben der Zellen durch einen osmotischen Schock ausgeschlossen werden kann. Sinnvoll ist ein Bereich in dem die Werte für die Osmolalität nicht mehr signifikant von dem Wert des Kontrollmediums abweichen.

Die 20%-Extrakte wiesen hinsichtlich ihrer Osmolalität noch eine signifikante Abweichung im Vergleich zum Kontrollmedium auf und hatten im Durchschnitt eine Osmolalität von 0,45 Osmol/kg. Die 10% Extrakte wiesen keine signifikant erhöhten Osmolalitäten mehr auf und hatten im Mittel eine Osmolalität von 0,4 Osmol/kg. Der Extrakttest kann als Prüfmethode für das Screenen von Magnesiummaterialien und der Erstellung eines Zytotoxizitäts-Rankings genutzt werden, wenn die Osmolalität 0,4 Osmol/kg der verwendeten Extrakte unterschreitet.

Zudem kann die Farbe des Extraktes als Indikator für die Zytotoxizität verwendet werden. Farblose Extrakte führten in dieser Arbeit immer zu zytotoxischen Ergebnissen, unabhängig vom Prüfmaterial, der Assay-Methode oder des verwendeten Zelltyps. Die Verwendung farbloser Extrakte kann daher von der Untersuchung der Zytotoxizität ausgeschlossen werden und reduziert somit Kosten- und Personalaufwand.



## 6 DIREKTER KONTAKTTEST NACH ISO-UND ASTM-NORM FÜR DIE ERMITTLUNG DER ZYTOTOXIZITÄT VON MAGNESIUMMATERIALIEN *IN VITRO* (EIGNUNGS- UND PROBLEMANALYSE UND LÖSUNGSMÖGLICHKEITEN)

In diesem Versuchsteil sollte analysiert werden, ob der Direkte Kontakttest nach ISO-Norm grundsätzlich für die Prüfung der Zytotoxizität von Magnesium-Implantatmaterialien geeignet ist. Die ISO-Norm empfiehlt für die quantitative Analyse der Zytotoxizität die Tetrazolium-basierten Assays MTT und XTT. Die Eignungsanalyse in Kapitel 4 hat gezeigt, dass eine Anwendung dieser Assays im direkten Kontakt nicht möglich ist. Daher wurde für die Direkten Kontakttests eine Lebend/Tot-Vitalfärbung verwendet, die bei der Eignungsanalyse zuverlässige Ergebnisse zeigte. Der Direkte Kontakttest wurde in drei verschiedenen Varianten angewendet. Variante 1 entsprach den Vorgaben der Normen ISO 10993-5 und ASTM 813-07 [13, 14]. Das Material wurde auf einen Zellrasen gelegt und inkubiert. Allerdings droht bei dieser Methode die Gefahr, dass die Zellen vom Prüfmaterial beschädigt oder beeinträchtigt werden. Wenn es notwendig ist, können die Zellen laut ISO Norm auch auf dem Material ausgesät und inkubiert werden. Bei dieser zweiten Variante des Direkten Kontakttests besteht allerdings die Gefahr, dass das Wachstum und die Adhäsion der Zellen durch hohe lokale pH-Werte, einer Akkumulation von Degradationsprodukten und einer erhöhten Osmolalität beeinträchtigt werden. Daher wurden bei der dritten Variante des Direkten Kontakttests die Zellen auf dem Material ausgesät und zusätzlich in einem Bioreaktorsystem einem kontinuierlichen Mediumfluss ausgesetzt, um die pH- und Osmolalitätswerte in physiologischere Bereich zu verschieben.

Für die Eignungsanalyse der Direkten Kontakttests wurden Magnesiumprüfmaterialien mit verschieden schnellem Degradationsverhalten eingesetzt. Mg<sub>0,6</sub>Ca(TG), Mg<sub>1</sub>Ca(TG) und Mg<sub>10</sub>Gd<sub>1</sub>Nd(TG) zeigten ein verhältnismäßig langsames Degradationsverhalten und waren nach dreitägiger Inkubation noch intakt. cpMg(TG), cpMg(KG), Mg<sub>6</sub>Ag(TG) und Mg<sub>6</sub>Ag(KG) zerfielen dagegen innerhalb der dreitägigen Inkubation. Dies verhinderte die Adhäsion der Zellen bei der Variante 2 des Direkten Kontakttests. Bei der dritten Variante des Direkten Kontakttests führte die Degradation der Prüfmaterialien zu einem Verstopfen der Schläuche des Bioreaktors. Daher wurden die schnell degradierenden Prüfmaterialien bei der Variante 2 und 3 des Direkten Kontakttests nicht in die Auswertung miteinbezogen.

## 6.1 Direkter Kontakttest - Variante 1: Material auf Zellen

Bei der ersten Variante des Direkten Kontakttests wurden Prüfmaterialien mit einem Durchmesser von 5 mm auf einem Zellrasen inkubiert. In der Kontrolle wurden die Zellen ohne Prüfmaterial in Zellkulturmedium inkubiert. Nach drei Tagen wurde das Prüfmaterial entfernt und die Viabilität der Zellen mit einer Lebend/Tot-Vitalfärbung überprüft.

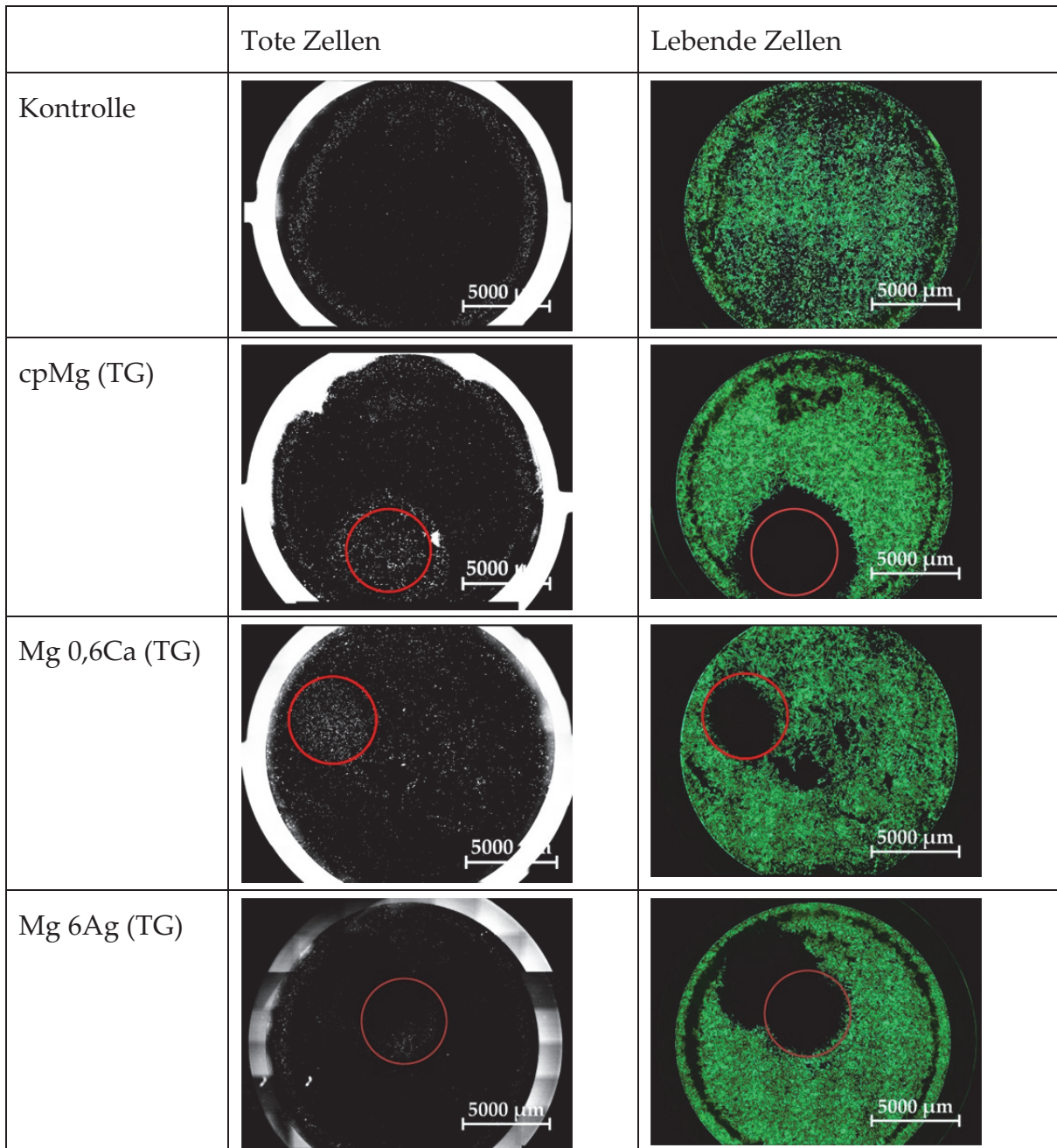


Abbildung 27: Ergebnisse des Direkten Kontakttests (Variante 1) für Kontrollzellen ohne Prüfmaterial und Zellen mit cpMg(TG-), Mg0,6Ca(TG)- und Mg6Ag(TG)-Prüfmaterial. Links: tote Zellen (weiß); Rechts: lebende Zellen (grün). Der rote Kreis markiert die Stelle, an der sich das Prüfmaterial am Ende des Versuchs befand.

Es wurden Übersichtsbilder gemacht, die das gesamte Zellkulturwell zeigen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt. Die linke Spalte zeigt die toten Zellen im gesamten Well. Die Zellkerne der toten Zellen wurden vom Vitalfarbstoff rot gefärbt. Zur besseren Sichtbarkeit ist der rote Farbstoff weiß dargestellt. Die rechte Spalte zeigt die lebenden Zellen (grün gefärbt) im gesamten Well. Der rote Kreis markiert die Stelle, an der sich das Prüfmaterial am Ende des Versuchs befand.

Für diesen Test wurden drei verschiedene Prüfmaterialien eingesetzt, die die Bandbreite der in dieser Arbeit verwendeten Prüfmaterialien umfasst. Magnesium mit 6 Gew.-% Silber (Mg6Ag(TG)) korrodierte im Vergleich zu den anderen in dieser Arbeit verwendeten Prüfmaterialien am stärksten, zeigte im Extrakttest die zytotoxischsten Ergebnisse und wurde daher als „worst case“-Material eingesetzt. Reinmagnesium und Magnesium mit 0,6 Gew.-% Calcium zeigten deutlich langsamere Korrosionsgeschwindigkeiten. Im Extrakttest führte Mg0,6Ca(TG) zu den zytokompatibelsten Ergebnissen.

Abbildung 27 zeigt, dass bei allen Prüfmaterialien um die Probe herum sehr viele lebende Zellen und nur wenige tote Zellen zu erkennen waren. Auch die Zellen, die mit der Mg6Ag(TG)-Probe inkubiert wurden, waren überwiegend viabel, und das, obwohl Mg6Ag(TG) deutlich korrosionsaktiver ist als die anderen verwendeten Prüfmaterialien und daher eine größere Toxizität erwartet wurde. Unter allen Prüfmaterialien fanden sich nur noch wenige bis gar keine lebenden Zellen, dafür aber sehr viele tote Zellen. Allerdings kam es nicht nur direkt unter den Prüfmaterialien zu einer örtlich begrenzten reduzierten Anzahl lebender Zellen, sondern auch an anderen Stellen im Well. Da die Prüfmaterialien bei diesem Prüfverfahren nicht örtlich fixiert waren, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Prüfmaterialien beim Transport zwischen Inkubator und steriler Werkbank bewegt und damit den Zellrasen beschädigt hatten. Sowohl eine Zytotoxizität des Prüfmaterials als auch das Abschieben von Teilen des Zellrasens durch Bewegung des Prüfmaterials kamen als mögliche Faktoren für die fehlenden oder toten Zellen in Frage. Für die Analyse der Zytotoxizität nach Normen soll die Viabilität der Zellen angrenzend an das Prüfmaterial erfasst werden. Allerdings konnte nicht eindeutig eine Stelle bestimmt werden, an der sich das Prüfmaterial während des gesamten Versuchs befand. Aufgrund der geringen Dichte von Magnesium und einem möglichen leichten Auftrieb der Prüfmaterialien, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Materialien sich bewegt hatten. Eine Erfassung der Viabilität der Zellen unter und angrenzend an das Prüfmaterial war daher nicht zuverlässig möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Prüfkörper entfernt, um alle Zellen im Well in die Auswertung miteinzubeziehen. Die ASTM Norm empfiehlt, das Prüfmaterial nicht zu entfernen und das Areal unter dem Prüfmaterial nicht in die Auswertung der Viabilität miteinzubeziehen [14]. Als Grund gibt die Norm an, dass unter dem Prüfkörper eine mangelnde Nährstoff- und Sauerstoffversorgung und ein Trauma durch den aufliegenden Prüfkörper drohen, die nichts mit der in dieser Prüfmethode zu ermittelnden Zytotoxizität zu tun hätten. Zudem weist die Norm

auf die Problematik des sich möglicherweise bewegenden Prüfkörpers und dem damit möglicherweise verbundenen Trauma für die Zellen hin. Die Zuverlässigkeit dieser Prüfmethode ist sowohl in der hier durchgeführten Art und Weise als auch in der Form, wie sie von den Normen beschrieben wird, fraglich. Die Ergebnisse von verschiedenartigen Magnesiumproben konnten daher mit dieser Prüfmethode nicht zuverlässig miteinander verglichen werden.

### **6.2 Direkter Kontakttest - Variante 2: Zellen auf Material**

Bei der zweiten Variante des Direkten Kontakttests wurden die Zellen auf dem Prüfmaterial ausgesät. Dadurch wurde die Gefahr einer Ablösung von Zellen durch ein sich bewegendes Prüfmaterial umgangen und eine zuverlässige Auswertung der Versuche und ein Vergleich der Prüfmaterialien möglich. Nach dreitägiger Inkubation wurden die Zellen mittels Lebend/Tot-Vitalfärbung angefärbt, um die Zytotoxizität des Prüfmaterials zu erfassen. Zusätzlich wurde die Osmolalität der Medien vor und nach dem Versuch gemessen. Des Weiteren wurde die farbliche Veränderung des Indikators Phenol Rot erfasst, welcher den pH-Wert-Bereich (physiologisch, leicht alkalisch, stark alkalisch) der Medien widerspiegelt.

Die Fluoreszenzbilder zeigen die Zellen nach der Lebend/Tot-Vitalfärbung auf den Prüfmaterialien in 10x-Vergrößerung (Abbildung 28). Zur besseren Darstellung des Phänotyps wurden die Zellen zudem mit einer 40x-Vergrößerung fotografiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ausgangsmaterialien der Implantatmaterialherstellung verwendet. Diese verfügen über eine deutlich größere Korrosionsaktivität als weiterverarbeitete Magnesiummaterialien (stranggepresst, temperatur- oder oberflächenbehandelt) oder permanente Implantatmaterialien. Die Ergebnisse zeigen, dass diese erhöhte Korrosionsaktivität der Prüfmaterialien für diese Prüfmethode ein Problem darstellte. Nach dreitägiger Inkubation adhärten nur noch sehr wenige Zellen auf den Oberflächen der Magnesiummaterialien. Die Titanreferenzen waren dagegen noch sehr gut bewachsen. Das Mg<sub>10</sub>Gd<sub>1</sub>Nd(TG)-Prüfmaterial korrodierte in den drei Tagen der Inkubation so stark, dass keine Zellen mehr auf dem Prüfmaterial zu finden waren. Stattdessen konnte eine aktive Bildung von korrosionsbedingten Gasblasen unter dem Mikroskop beobachtet werden. Auf der Mg<sub>1</sub>Ca(TG)- und Mg<sub>0,6</sub>Ca(TG)-Probe waren nur wenige lebendige Zellen. Die 40x-Vergrößerungen zeigten allerdings, dass diese wenigen Zellen gut adhärten und ausgestreckt waren. Die Zellen sahen in der 40x-Vergrößerung vergleichbar vital aus wie die Zellen auf dem Titanreferenzmaterial.

Diese Ergebnisse entsprachen zur Hälfte den elektrochemisch gemessenen initialen Korrosionsgeschwindigkeiten der Prüfmaterialien (siehe Kapitel 3.6.4). Mg<sub>10</sub>Gd<sub>1</sub>Nd(TG) und Mg<sub>1</sub>Ca(TG) hatten mit 0,61 mm/Jahr bzw. 0,65 mm/Jahr eine

höhere initiale Korrosionsgeschwindigkeit als Mg0,6Ca(TG) mit 0,52 mm/Jahr. Allerdings war Mg10Gd1Nd(TG) in der elektrochemischen Untersuchung etwas korrosionsstabiler als Mg1Ca(TG), was im Falle des Zytotoxizitätstests nicht der Fall war. Daher kann man nicht unbedingt von der initialen Korrosionsgeschwindigkeit auf das dreitägige Degradationsverhalten schließen.

Die Osmolalitätsmessung der Medien (Abbildung 28) zeigte, dass das Medium der Titanreferenz am Ende der Inkubation eine vergleichbare Osmolalität hatte wie das Startmedium. Die Medien der Magnesium-Calcium-Proben hatten eine leicht erhöhte Osmolalität verglichen mit dem Startmedium. Die mit Abstand höchste Osmolalität wurde für die Mg10Gd1Nd(TG)-Proben gemessen.

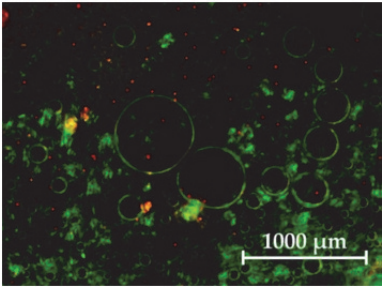
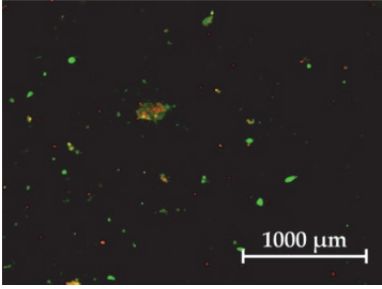
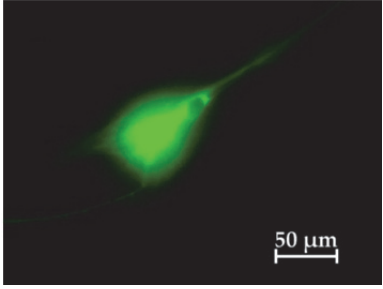
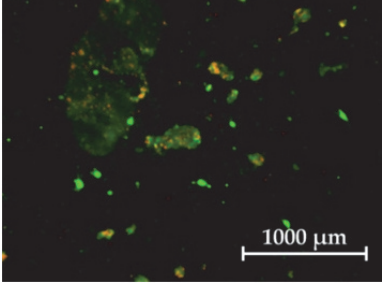
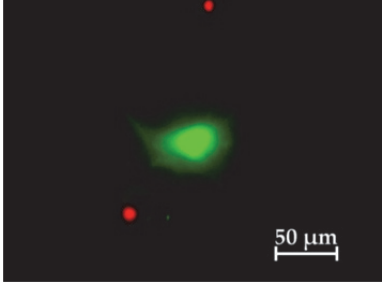
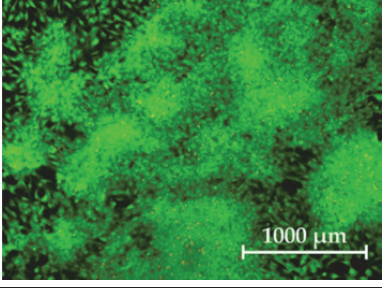
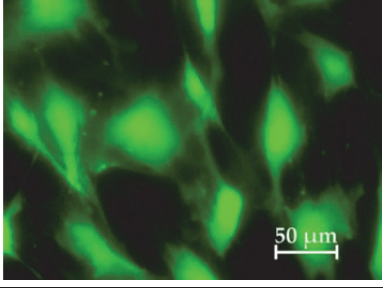
	10x-Vergrößerung	40x-Vergrößerung
Mg 10Gd 1Nd (TG) (0,45 Osmol/kg)		
Mg 1Ca (TG) (0,37 Osmol/kg)		
Mg 0,6Ca (TG) (0,37 Osmol/kg)		
Titan (0,34 Osmol/kg)		
Startmedium (0,34 Osmol/kg)		

Abbildung 28: Ergebnisse der Lebend/Tot-Vitalfärbung fotografiert mit einem Fluoreszenzmikroskop mit 10x-Vergrößerung und mit 40x-Vergrößerung zur genaueren Darstellung des Phänotyps.

## DIREKTER KONTAKTTEST

Die Farbe der Medien veränderte sich abhängig vom eingesetzten Prüfmaterial (Abbildung 29). Die Medienfarben der Titanreferenz waren noch so hellrot wie das Medium beim Start des Tests, das für alle Prüfmaterialien eingesetzt wurde. Die Medienfarben von Mg<sub>0,6</sub>Ca(TG) und Mg<sub>1</sub>Ca(TG) waren rotviolett, was auf eine Erhöhung des pH-Wertes hindeutet. Die Medien von Mg<sub>10</sub>Gd<sub>1</sub>Nd(TG) waren farblos. Dies ist ein Hinweis für einen stark alkalischen pH-Wert. Messungen mit einem pH-Meter zeigten allerdings keinen Unterschied zu den rotvioletten Medien der Magnesium-Calcium-Proben. Es wurden pH-Werte <8,5 gemessen, welche in keiner Weise zu einer Entfärbung des Indikators führen würden. Es war nicht klar, warum das Medium farblos wurde und zudem blieb. Die Entfärbung des Indikators war nicht 100%-ig mit einem erhöhten pH-Wert erklärbar, da eine Entfärbung des Farbstoffs reversibel ist und aufgrund des niedrigen pH-Wertes hätte stattfinden müssen.

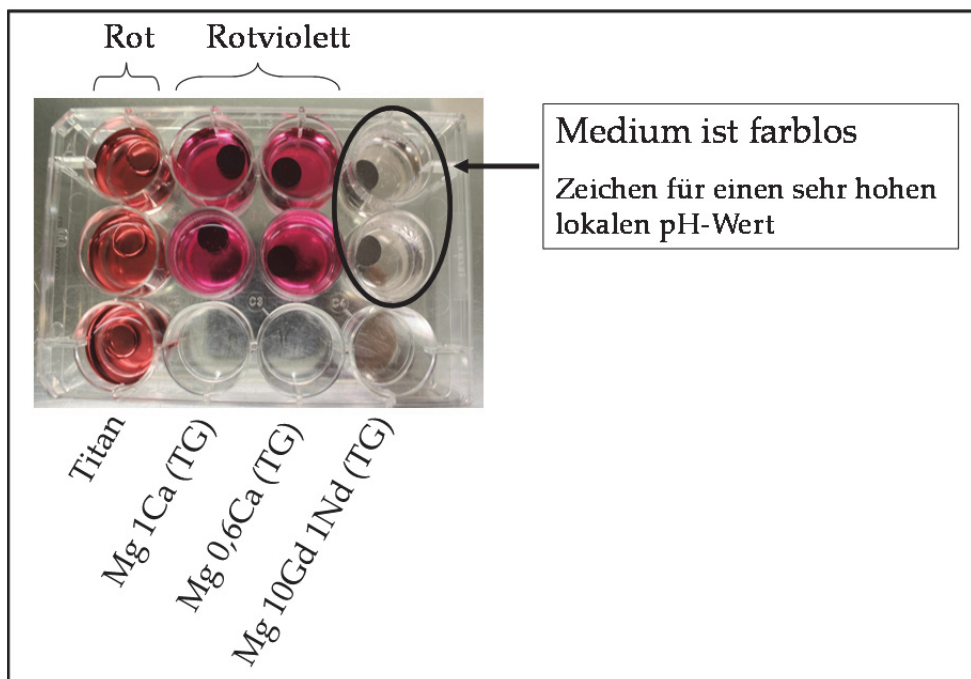


Abbildung 29: Farbe des Indikators Phenol Rot in den Medien nach der dreitägigen Inkubation im statischen System.

Die Farbe des Mediums entspricht allerdings dennoch eher den Ergebnissen der Zytotoxizität der Materialien als die Osmolalität. Medien mit einer Farbe vergleichbar mit der des Zellkulturmediums (hellrot) waren zytokompatibel. Rotviolette Farben entstanden bei der Inkubation von Prüfmaterialien bei denen das Ergebnis zwar nicht zytokompatibel war, aber immerhin lebende Zellen auf dem Material adhärirten. Bei farblosen Medien waren nach der dreitägigen Inkubation gar keine Zellen mehr auf den Prüfmaterialien auffindbar.

### **6.3 Direkter Kontakttest - Variante 3: Zellen auf Material im Bioreaktorsystem**

Bei der dritten Variante des Direkten Kontakttests wurden die Zellen auf dem Prüfmaterial im Bioreaktor inkubiert. Zuerst wurde eine geeignete Zellzahl für eine optimale Ansiedelung auf dem Prüfmaterial und eine geeignete Fließgeschwindigkeit für die Durchführung der Bioreaktorversuche ermittelt. Als Parameter zur Bestimmung einer geeigneten Zellzahl und Fließgeschwindigkeit wurde die Viabilität der Zellen gewählt. Nach Ermittlung geeigneter Bedingungen wurde die Zytotoxizität verschiedener Prüfmaterialien im Bioreaktorsystem untersucht. Dabei wurden die Prüfmaterialien für 72 h im Kontakt mit Zellen getestet. Ein 72-stündiger Kontakt wurde gewählt, um eine Vergleichbarkeit mit der statischen Variante 2 des Direkten Kontakttests zu haben.

#### **Geeignete Zellzahl und Fließgeschwindigkeit für den Bioreaktorversuch**

Für die Ermittlung geeigneter Parameter wurden Osteoblasten anhand des Protokolls zur Ermittlung der Zytotoxizität von Prüfmaterialien im Bioreaktor kultiviert (Kapitel 3.4.4). Für die Präinkubation wurden die Prüfmaterialien 2 h im Bioreaktor bei 0,5 mL/min oder 1 mL/min inkubiert und dann unter der Werkbank getrocknet. Am darauffolgenden Tag wurden Osteoblasten in den Zellzahlen 5000 Zellen, 25000 Zellen, 50000 Zellen und 75000 Zellen pro Prüfmaterial ausgesät und zum Adhären 30 min statisch inkubiert. Danach wurden die Zellen auf den Reintitanplättchen im Bioreaktor 2 h unter Zellkulturbedingungen bei einer Fließgeschwindigkeit des Zellkulturmediums von 0,5 mL/min oder 1 mL/min kultiviert. Die Anzahl der lebenden adhären Osteoblasten mit Hilfe einer Calcein-Färbung (Lebend/Tot-Vitalfärbung) ermittelt. Die Übersichtsbilder sind in Abbildung 30 dargestellt und zeigen für jede Titanprobe das gesamte Well mit dem Prüfmaterial und den darauf adhären lebenden Zellen.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine ausgesäte Zellzahl von 5.000 und 25.000 Zellen pro Prüfmaterial, sowohl für das Magnesium- als auch für das Titanmaterial, zu wenig war, um einen konfluenten Zellrasen auf dem Prüfmaterial zu generieren. Eine Zellzahl von 50.000 und 75.000 Zellen pro Plättchen führte dagegen zu einer deutlich besseren verbleibenden Zelldichte. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus den dynamischen Bioreaktortests (Direkter Kontakttest Variante 3) mit der statischen Variante 2 des Direkten Kontakttest wurde daher im weiteren Verlauf der Arbeit für diese Prüfmethode eine Zellzahl von 75.000 Zellen pro Prüfmaterial angewendet. Die beiden gemessenen Fließgeschwindigkeiten führten innerhalb der zweistündigen Testzeit zu keinem messbaren Unterschied. Bei beiden Geschwindigkeiten waren die Plättchen nach 2 h Bioreaktorlauf immer noch konfluent bewachsen und die Zellen gut adhären. Im weiteren Verlauf wurde für

## DIREKTER KONTAKTTEST

die Durchführung der Zytotoxizitätstests im Bioreaktor eine Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min gewählt, da der schnellere Medienaustausch bei den Magnesium-Prüfmaterialien theoretisch die erhöhten pH- und Osmolalitätswerte vermehrt senken sollte. Überprüft wurde dies allerdings nicht, da die lokale Messung des pH- und Osmolalitätswertes direkt an der Probe mit diesem Aufbau nicht möglich war.

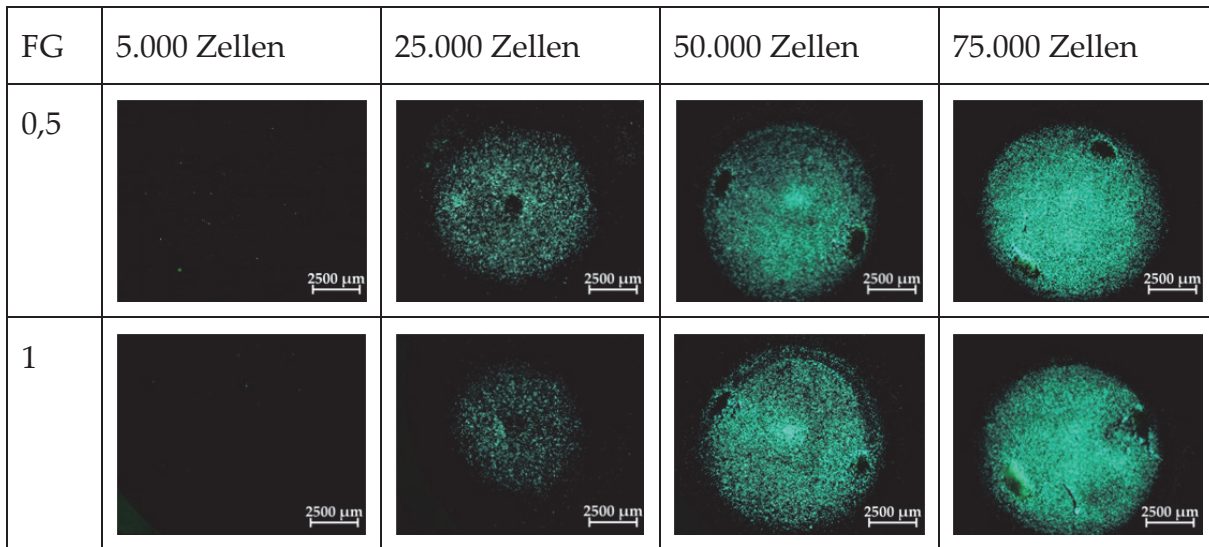


Abbildung 30: Die Fluoreszenzbilder zeigen die lebenden mit Calcein grün gefärbten Osteoblasten in der Übersicht auf dem gesamten Reintitan-Prüfmaterial nach zweistündigem Bioreaktorlauf. Untersucht wurden vier verschiedene ausgesäte Zelldichten (5.000, 25.000, 50.000 und 75.000 Zellen pro Probenplättchen) und zwei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten (FG) (0,5 mL/min und 1 mL/min).

Mit Hilfe eines 72-stündigen Bioreaktorlaufes wurde daraufhin untersucht, ob die anhand des zweistündigen Tests gewählten Parameter (1 mL/min, 75000 Zellen/Prüfmaterial) für die 72-stündige Inkubation im Bioreaktor geeignet waren. Ziel war es herauszufinden, ob die Bedingungen für die Zellen im Bioreaktor vergleichbar waren mit den Bedingungen in einer statischen Kultur. Die Untersuchung wurde nach den Protokollen zur Ermittlung der Zytotoxizität von Prüfmaterialien im statischen (Kapitel 3.4.3) und dynamischen System (Kapitel 3.4.4) durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung haben gezeigt, dass die Anzahl der lebenden adhärenenden Osteoblasten nach 72-stündiger Kultivierung im Bioreaktor mit der Anzahl im statischen System vergleichbar war (Abbildung 31). Daraus wurde geschlossen, dass das Bioreaktorsystem durchaus für die Ermittlung der Zytotoxizität von Prüfmaterialien geeignet ist. Zudem zeigte das Ergebnis, dass die gewählten Parameter im weiteren Verlauf für die Bioreaktortests verwendet werden können und dadurch eine Möglichkeit der Vergleichbarkeit mit Ergebnissen aus statischen Untersuchungen möglich ist.

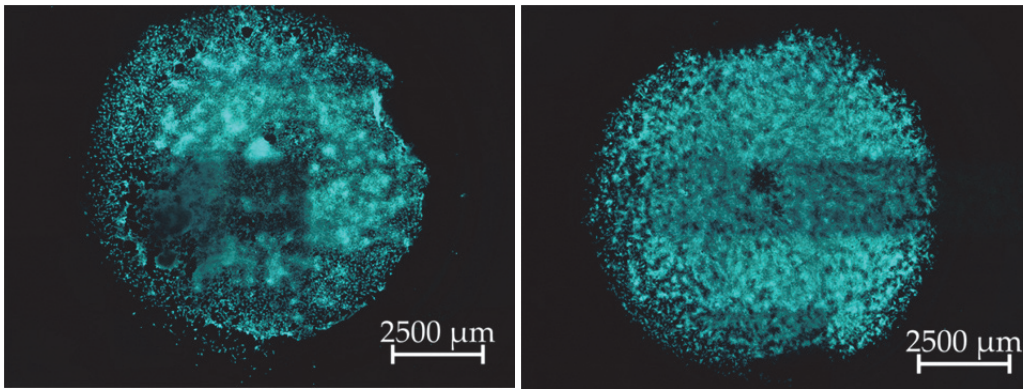


Abbildung 31: Übersichts-Fluoreszenzbilder von Calcein-gefärbten Osteoblasten auf Reintitan. Das linke Bild zeigt die lebenden Zellen nach 72-stündiger statischer Inkubation auf einer Well-Platte. Das rechte Bild zeigt die lebenden Zellen nach 72-stündiger dynamischer Inkubation (Fließgeschwindigkeit: 1 mL/min) im Bioreaktor.

### Zytotoxizitätstest über 72 Stunden

Für die Messung der Zytotoxizität der Magnesiummaterialien im fließenden System wurden Osteoblasten auf Magnesiumprüfmaterialien und dem Titanreferenzmaterial im Bioreaktor 72 Stunden bei 1 mL/min inkubiert.

Vergleichbar mit den Ergebnissen der statischen Untersuchungen (Kapitel 6.2) stellte auch bei der dynamischen Variante des Direkten Kontakttests die geringe Korrosionsstabilität der Magnesiumprüfmaterialien ein Problem dar. Auf dem Mg<sub>10</sub>Gd<sub>1</sub>Nd(TG)-Prüfmaterial adhärten keine Zellen mehr nach der dreitägigen Inkubation (Abbildung 32). Auf diesen Proben waren nur Gasblasen aber keine Zellen mehr zu finden. Auf Mg<sub>1</sub>Ca(TG) waren nur wenige, jedoch lebendige Zellen zu finden. Am meisten Zellen fanden sich auf Mg<sub>0,6</sub>Ca(TG). Die Kontrolle (Zellen auf Reintitan) zeigte mit Abstand die größte Zellzahl. Im Vergleich zum statischen Direkten Kontakttest (Variante 2), fanden sich beim Bioreaktorversuch mehr Zellen auf den Probenplättchen für die Magnesium-Calcium-Proben als bei der statischen Variante. Auf der Titanreferenzprobe waren vergleichbar viele Zellen zu finden im Vergleich zum statischen Test. Das bestätigt, dass das Bioreaktorsystem an sich für die Kultivierung von Zellen geeignet ist und für eine Analyse der Zytotoxizität von nicht-degradierenden Prüfmaterialien hervorragend geeignet ist. Die 40x-Vergrößerung zeigte, dass die Zellen auf den Magnesium-Calcium-Proben gut adhärten waren und einen ausgestreckten Phänotyp aufwiesen (Abbildung 32).

Die Messung der Osmolalität der Medien ergab bei der Titanreferenz und den Magnesium-Calcium-Proben Werte, die vergleichbar waren mit dem Startmedium (Abbildung 32). Mg<sub>10</sub>Gd<sub>1</sub>Nd(TG)-Proben führten dagegen zu einer deutlichen Erhöhung der Osmolalität in der Vorratsflasche und das, obwohl beim Bioreaktor mehr als die fünffache Menge an Medium im Verhältnis zur Probenmasse eingesetzt wurde, als im statischen System. Beim Bioreaktortest wurden 50 mL Medium für drei Prüfmaterialien verwendet, während bei der statischen Kultivierung (Kapitel 6.2) nur

## DIREKTER KONTAKTTEST

3 mL Medium auf ein Prüfmaterial gegeben wurde. Eine mögliche Erklärung für die verhältnismäßig höhere Osmolalität wäre ein verstärkter Zerfall des Prüfmaterials oder ein verstärkter Abtransport von Degradationsprodukten.

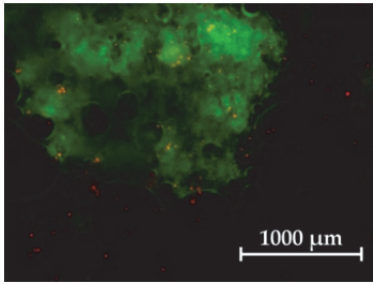
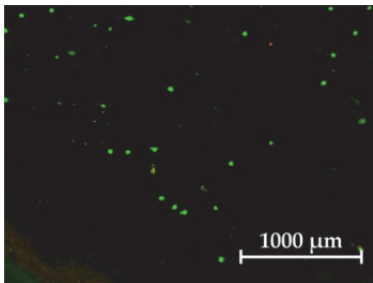
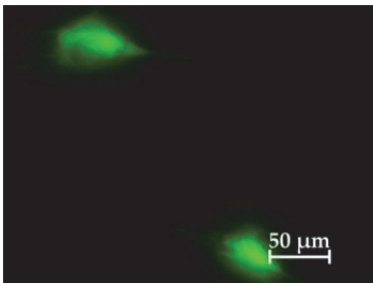
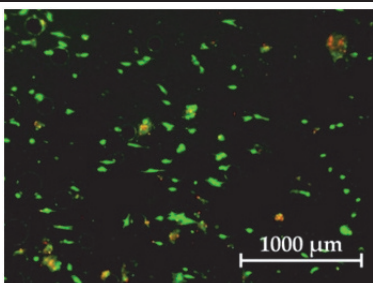
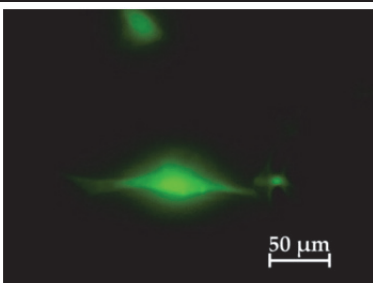
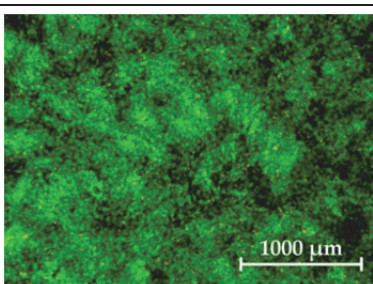
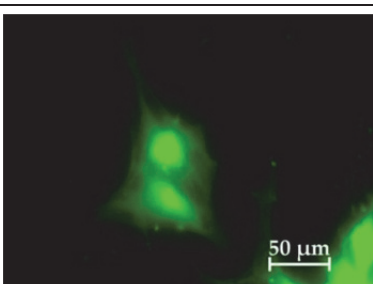
	4x-Vergrößerung	40x-Vergrößerung
Mg 10Gd 1Nd (TG) (0,42 Osmol/kg)		
Mg 1Ca (TG) (0,34 Osmol/kg)		
Mg 0,6Ca (TG) (0,34 Osmol/kg)		
Titan (0,34 Osmol/kg)		
Startmedium (0,34 Osmol/kg)		

Abbildung 32: Ergebnisse des dreitägigen Zytotoxizitätstests im Bioreaktor, fotografiert mit 4x-Vergrößerung (A) und 40x-Vergrößerung (B) zur besseren Darstellung des Phänotyps. In Klammern ist die Osmolalität der Medien nach dem dreitägigen Bioreaktorlauf und des Ausgangsstartmediums angegeben. Lebende Zellen sind grün fluoreszierend und tote Zellen rot fluoreszierend eingefärbt.

Die Farbe der Medien war bei Titan und den Magnesium-Calcium-Prüfmaterialien nach dem Bioreaktorlauf genauso rot wie das Startmedium (Abbildung 33). Damit befanden sich die pH-Werte dieser Medien in einem für die Zellen physiologischen Bereich. Die Korrosion der Mg10Gd1Nd(TG)-Proben führte dagegen zu einer Erhöhung des pH-Wertes, der durch die rotviolette Farbe des Mediums

gekennzeichnet wurde. Die Messung des pH-Wertes des Mg10Gd1Nd-Mediums mit einem pH-Meter zeigte allerdings keinen Unterschied zu den Medien der Magnesium-Calcium-Proben. Es war nicht klar, warum der Farbwechsel zu Rot ausblieb, der aufgrund des ähnlichen pH-Wertes hätte stattfinden müssen.

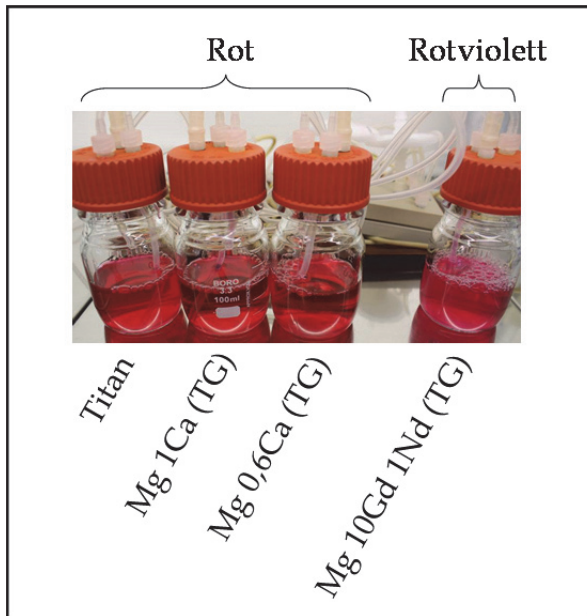


Abbildung 33: Farbe der Medien nach dem dreitägigen Bioreaktorlauf.

Das schnell degradierende Prüfmaterial Mg10Gd1Nd(TG) führte im Bioreaktor wie auch bei der statischen Variante 2 des Direkten Kontakttests zu stark zytotoxischen Ergebnissen. Allerdings war das Medium nur rotviolette statt weiß und auch die Erhöhung der Osmolalität war nicht so stark wie beim statischen Test. Eine Erklärung stellt die Verdünnung dar. Beim Bioreaktorversuch wurden 50 mL Medium pro Segment (drei Proben hintereinander) genutzt und bei der statischen Variante nur 3 mL.

### Kontinuierliche unbeeinflusste pH-Wert-Messung im Bioreaktor und zum Vergleich im statischen System

Um ein besseres Verständnis zu erlangen über die pH-Wert-Entwicklung während der Bioreaktorinkubation, wurde eine kontinuierliche Messung des pH-Wertes im Inkubator mit Hilfe eines *Presens Sensor Dish (SD) Readers* durchgeführt. Parallel dazu wurde eine kontinuierliche Messung des pH-Wertes für eine statische Inkubation vorgenommen. Für diese Untersuchung wurden Reinformmagnesiumproben (cpMg(KG)) für neun Stunden in Zellkulturmedium unter Zellkulturbedingungen im Bioreaktor mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min inkubiert bzw. 20 Stunden statisch direkt auf einer *Presens-Sensor-Platte*. Mit dem *Presens-System* können pH-Werte zwischen 5,0 und 9,0 gemessen werden. pH-Werte oberhalb von 9,0 wurden daher systembedingt auf 9,0 gesetzt.

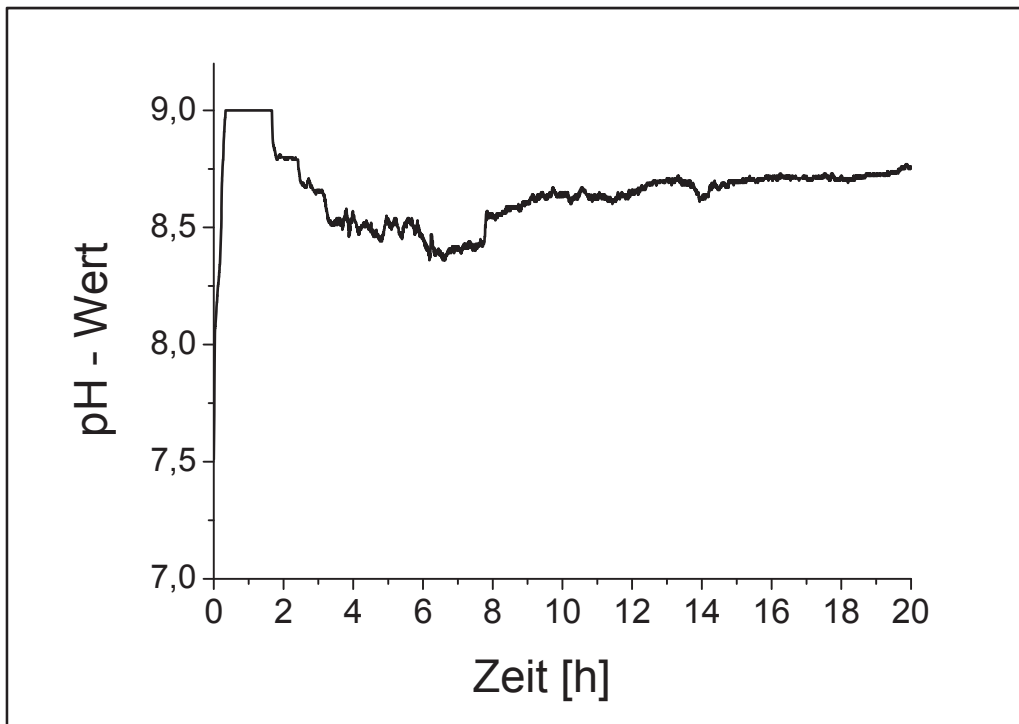


Abbildung 34: Mit einem SD-Reader kontinuierlich gemessener pH-Wert bei einer statischen Inkubation von Reinmagnesium in Zellkulturmedium über 20 Stunden. Das Presens-System kann nur pH-Werte zwischen 5,0 und 9,0 erfassen.

Die statische Inkubation der Reinmagnesiumprobe in Zellkulturmedium zeigte den erwarteten starken Anstieg des pH-Wertes. Innerhalb der ersten beiden Stunden stieg der pH-Wert auf über 9,0. Durch die Pufferwirkung des Zellkulturmediums stabilisierte sich der pH-Wert daraufhin auf Werte zwischen 8,4 und 8,7 (Abbildung 34).

Die dynamische Inkubation der Reinmagnesium-Prüfmateriale im Bioreaktor zeigte, dass der pH-Wert des Mediums trotz neunständigen Kontakts mit Reinmagnesium im Bioreaktor in einen für Knochenzellen physiologischen Bereich verschoben und dort gehalten wurde (Abbildung 35). Das zugeführte Medium erfuhr nur einen leichten pH-Wert-Anstieg von etwa 0,05 durch den Kontakt mit dem Prüfmateriale.

Dieses Ergebnis hatte zwei Aussagen. Erstens konnte mit diesem Ergebnis gezeigt werden, dass es unproblematisch ist, dass sich die Medienvorratsflaschen und Pumpen außerhalb des Inkubators befanden. Der pH-Wert des Mediums wurde in der Zeit, in der sich das Medium in den Schläuchen und in der Fließkammer im Inkubator befand, genügend mit CO<sub>2</sub> versorgt und in einen physiologischen Bereich gepuffert. Zweitens zeigte die Messung, dass die Bedingungen für die Zellen durch die Verwendung des Bioreaktors deutlich verbessert werden könnten, da der pH-Wert auf physiologische Werte ausgeglichen und stabilisiert werden kann.

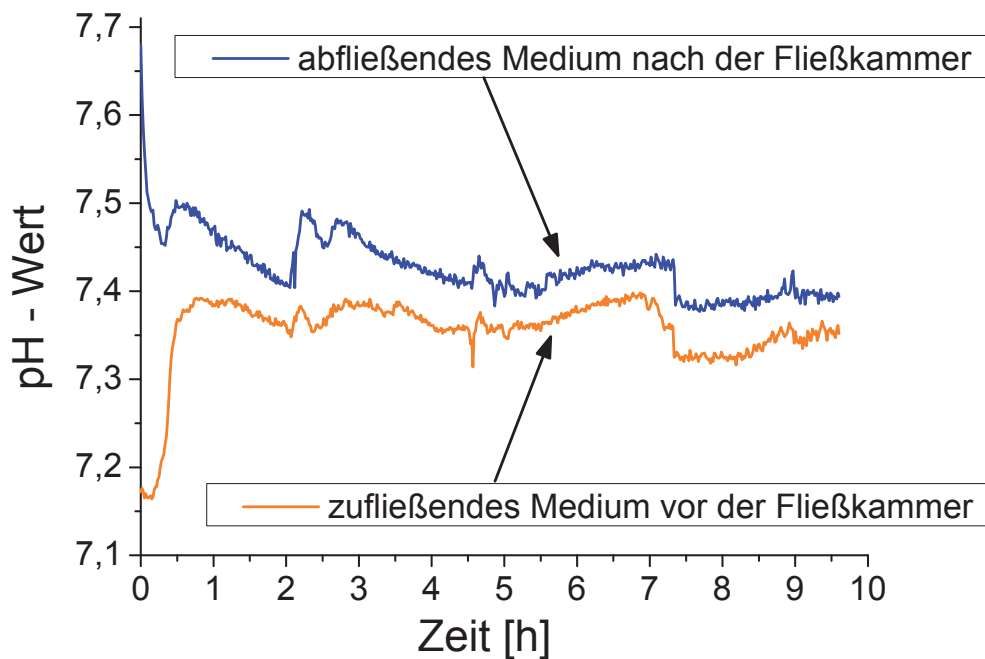


Abbildung 35: Mit einem SD-Reader kontinuierlich gemessener pH-Wert für einen Bioreaktorlauf mit Reinmagnesiumproben (drei Proben hintereinander in der Fließkammer) über neun Stunden.

## 6.4 Diskussion und abschließende Beurteilung des Direkten Kontakttests

Der Direkte Kontakttest wurde in drei verschiedenen Varianten angewendet. Bei Variante 1 (Prüfmaterial auf subkonfluenten Zellrasen) war es nicht möglich, den genauen Grund für die toten oder fehlenden Zellen zu identifizieren. Bewegung des Prüfmaterials, statischer Druck durch das Prüfmaterial, mangelnde Nährstoffversorgung oder Zytotoxizität des Prüfmaterials kamen in Frage. Die Ergebnisse bestätigen damit die Warnungen der ASTM-Norm [14]. Diese Methode sollte daher für zukünftige Zytotoxizitäts-Untersuchungen nicht verwendet werden. Für den Fall, dass eine Inkubation des Prüfmaterials auf dem Zellrasen zu keinem befriedigenden Ergebnis führt, kann laut ISO-Norm auch eine Inkubation der Zellen auf dem Prüfmaterial angewendet werden. Damit kann die Problematik umgangen werden, dass das Prüfmaterial den Zellrasen beschädigt. Bei der Variante 2 des Direkten Kontakttests wurden die Zellen daher auf dem Prüfmaterial kultiviert. Allerdings stellte die geringe Korrosionsstabilität der Prüfmaterialien ein Problem dar. Die Ergebnisse zeigten, dass nach drei Tagen kaum noch Zellen auf den Magnesiumprüfmaterialien zu finden waren, während die Titanreferenz gut bewachsen war. Durch die Degradation der Prüfmaterialien war die Osmolalität der Medien nach der Inkubation erhöht bis stark erhöht. Während der Lebend/Tot-Vitalfärbung war die Entwicklung von Gasblasen auf den Mg<sub>10</sub>Gd<sub>1</sub>Nd(TG)-Prüfmaterialien unter dem Mikroskop sichtbar, was auf eine beschleunigte Korrosionsaktivität hindeutet. Das Medium beim Mg<sub>10</sub>Gd<sub>1</sub>Nd(TG)-Prüfmaterial

## DIREKTER KONTAKTTEST

---

war farblos, was ein Anzeichen für einen sehr hohen alkalischen pH-Wert ist. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die konzentrierten Bedingungen auf der 24-Well-Platte bei der statischen Kultivierungsform für die Prüfung von schnell degradierenden Magnesiumprüfmaterialien ein Problem darstellten. Für stark korrodierende Magnesiumprüfmaterialien ist diese Methode daher nicht geeignet. Für langsam degradierende und permanente Materialien ist diese Methode dagegen durchaus geeignet.

Im Körper des Menschen wird das Implantat im Knochen von Blut, Lympflüssigkeit und Extrazellulärflüssigkeiten umspült. Dabei werden Korrosionsprodukte weggespült und die Osmolalität steigt daher lokal nicht so stark an. Der pH-Wert wird mit Hilfe eines komplexen Systems kontinuierlich in einem physiologischen Bereich gehalten. Diese Stabilisierung eines für die Zellen physiologischen pH-Wertes und die Senkung der lokalen Osmolalität durch Abtransport von Degradationsprodukten, sollte mit Hilfe eines Bioreaktorsystems nachempfunden werden. Der Direkten Kontakttest – Variante 3 verfügte im Vergleich zu Variante 2 daher zusätzlich über den Parameter eines kontinuierlichen Medienflusses. Dafür wurde ein Fließkammersystem genutzt, welches für die 3D-Kultivierung von humanen Zellen zur Ermittlung der *in vitro*-Toxizität von Biomaterialien etabliert wurde [106]. Das Layout der Fließkammer entspricht einer 24-Well-Zellkulturplatte, wie sie für die statische Versuchsdurchführung (Direkter Kontakttest - Variante 2) verwendet wurde. Dies bot die Möglichkeit beide Kultivierungsverfahren (statisch und dynamisch) miteinander zu vergleichen.

Die Fließgeschwindigkeit war ein wichtiger Faktor bei der Entwicklung des Testsystems. Die Zellen mussten ausreichend mit Sauerstoff versorgt und der lokale hohe pH-Wert und die erhöhte lokale Osmolalität physiologisch ausgeglichen werden. Dabei durften allerdings die Scherkräfte durch eine zu hohe Fließgeschwindigkeit nicht zu groß werden. In der Literatur finden sich Fließgeschwindigkeiten von 1 mL/min [106], 0,5 mL/min [134] oder 0,06 – 3,8 mL/min [135]. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass eine Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min eine ausreichend schneller Erneuerung der Medien zwecks pH- und Osmolalitätsausgleich bietet. Beim nicht korrodierenden Kontrollmaterial Titan waren die Proben nach einem zweistündigen Lauf im Bioreaktor gut bewachsen. Ein Parallelansatz, bei dem Zellen 72 h auf dem Kontrollmaterial Reintitan im dynamischen System im Bioreaktor und im statischen System auf einer Well-Platte inkubiert wurde, zeigte, dass die Anzahl der lebenden und adhärierenden Zellen vergleichbar war. Dies zeigt, dass das Bioreaktorsystem mit den gewählten Parametern (Fließgeschwindigkeit: 1 mL/min; Ausgesäte Zelldichte: 75000 Zellen/Prüfmaterial) durchaus für die Prüfung der Zytotoxizität geeignet ist.

Eine kontinuierliche *in situ*-Messung des pH-Wertes über neun Stunden während eines Bioreaktorlaufes zeigte, dass der pH-Wert durch den Medienfluss stabil im für

Knochenzellen physiologischen Bereich von  $7,4 \pm 0,1$  gehalten wurde. Dies bietet eine gute Basis für die Simulation der *in vivo*-Bedingungen im Körper.

Allerdings zeigten die Ergebnisse der dynamischen Kultivierung für drei Tage keine Verbesserung der Bedingungen hinsichtlich Adhäsion und Viabilität für die Zellen auf den degradierenden Magnesiumprüfmaterialien gegenüber der statischen Kultivierung. Die dynamische Komponente des kontinuierlichen Medienflusses wurde eingesetzt, um die korrosionsbedingt hohen pH-Werte und die hohe Osmolalität am Prüfmaterial zu senken. Durch die Annäherung an die *in vivo*-Situation sollten die Bedingungen für die Zellen physiologischer werden, um die Adhäsion und Viabilität der Zellen zu verbessern. Allerdings kam es wie auch bei der Variante 2 des Direkten Kontakttests zur Bildung von korrosionsbedingten Gasblasen aus den Prüfmaterialien. Eine mögliche Erklärung für die verstärkte Korrosion bieten der physiologische pH-Wert und die Chloridionen-Konzentration. Die Korrosion von Magnesium hängt stark vom pH-Wert und der Chloridionen-Konzentration ab. Bei einem pH-Wert  $>11$  entsteht bei der Degradation von Magnesium das Korrosionsprodukt  $Mg(OH)_2$ , welches sich auf dem Prüfmaterial ablagert und so eine Schutzschicht bildet [136], die eine weitere Korrosion nahezu unterbindet. Dies ist der Fall für die Verwendung von ungepufferten Prüflösungen. Durch die fehlende Pufferwirkung kommt es zu einer verstärkten Akkumulation von OH-Ionen und damit zu dem starken pH-Wert-Anstieg. Allgemein gilt, je basischer der pH-Wert und/oder je niedriger die Chloridionen-Konzentration, desto langsamer die Korrosion. Je saurer der pH-Wert und/oder je höher die Chloridionen-Konzentration, desto schneller die Korrosion [137]. Durch die Verwendung von gepufferten Prüflösungen wird der pH-Wert im physiologischen und damit neutralen Bereich verschoben und gehalten. Damit steigt die Korrosionsaktivität der Magnesiumprüfmaterialien an. Durch die fehlenden OH-Ionen und die hohen Chloridionen-Konzentrationen der Prüflösungen wird keine Schutzschicht aus  $Mg(OH)_2$  gebildet. Während  $Mg(OH)_2$  in einem alkalischen Milieu bei pH-Werten von  $>8,5-11$  schlecht löslich ist und sich auf der Magnesiumprobe absetzt, wird es bei neutralen pH-Werten löslich [84]. Durch eine erhöhte Chloridionen-Konzentration wird  $Mg(OH)_2$  vermehrt in  $MgCl_2$  umgewandelt. In beiden Fällen kommt es zu einem Anstieg der Korrosionsaktivität. Durch den kontinuierlichen Medienfluss im Bioreaktor wurde die Korrosionsaktivität der Magnesiumprüfmaterialien daher möglicherweise noch verstärkt. Chloridionen-reiches Medium wurde kontinuierlich zugeführt und das aufgrund des neutralen pH-Wertes lösliche Degradationsprodukt  $Mg(OH)_2$  wegtransportiert. Dies sind mögliche Faktoren für eine Erhöhung der Korrosionsaktivität und der damit verbundenen Gasblasenbildung. Es ist daher keine der drei Varianten des Direkten Kontakttests für die Prüfung der Zytotoxizität von stark korrodierenden Magnesiummaterialien geeignet. Weiterverarbeitete Magnesiumprüfmaterialien, die z.B. stranggepresst, temperatur- oder oberflächenbehandelt wurden, verfügen in der Regel über eine deutlich höhere Korrosionsstabilität. Die Ergebnisse zeigten, dass die Zellen auf den nicht-degradierenden Titanmaterialien sowohl bei der Variante 2 als auch 3 des Direkten

## DIREKTER KONTAKTTEST

---

Kontakttests nach dreitägiger Inkubation zu einem gut adhärenen Zellrasen mit sehr hoher Viabilität bildeten. Für langsam degradierende und permanente Prüfmaterialien sind Variante 2 und 3 des Direkten Kontakttests daher durchaus geeignet.

Bisher ist es nicht zuverlässig möglich, Ergebnisse aus *in-vitro*-Zytotoxizitätstests mit Ergebnissen aus *in vivo*-Untersuchungen zu korrelieren. Die Magnesiummaterialien verhalten sich *in vivo* und *in vitro* zu unterschiedlich [138]. Um mit Ergebnissen aus *in vitro*-Zytotoxizitätstests die möglichen *in vivo*-Situation besser prognostizieren zu können, müssen die Bedingungen wie sie im Gewebe sind noch genauer simuliert werden. Dafür ist eine Optimierung und Anpassung des Bioreaktorsystems notwendig. Sinnvoll wäre eine Flusszelle mit direkt angeschlossener Messtechnik zur automatischen Erfassung und Steuerung von pH-Wert, Osmolalität, Temperatur, Sauerstoff- und Glucosegehalt, Fließgeschwindigkeit und Viabilität. Laut Literatur ist die Korrosionsgeschwindigkeit von Magnesiummaterialien abhängig von der Fließgeschwindigkeit der Gewebeflüssigkeiten und der Durchblutung des jeweiligen Gewebes und des Diffusionskoeffizienten für Wasserstoff [138]. Ergebnisse aus der Literatur zeigen, dass die Korrosion von Magnesiummaterialien *in vivo* deutlich langsamer verläuft als *in vitro* [15, 44, 73]. *In vivo* ist das Implantatmaterial in Gewebe eingebettet. Die Fließgeschwindigkeit der Flüssigkeiten entspricht einer großen Bandbreite an verschiedenen Geschwindigkeiten in den Gefäßen bis hin zu Diffusion im Gewebe. Um die Diffusion im Gewebe zu simulieren, könnten die Prüfmaterialien z.B. mit den Zellen in eine gewebeartige Matrix eingebettet und dann in den Bioreaktor eingesetzt werden. Wichtig bei der Wahl des Matrixmaterials ist die Notwendigkeit einer genügenden Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff und der Durchlässigkeit von Wasserstoff. Problematisch könnten hierbei der Abtransport von Kohlendioxid und eine mögliche Akkumulation von Degradationsprodukten und wiederum einer erhöhten Osmolalität sein. Notwendig für eine Verbesserung des Bioreaktorversuches ist in jedem Fall ein besseres Verständnis der Fließbedingungen im Knochengewebe *in vivo*. Die Fließgeschwindigkeit im menschlichen Knochen ist bislang nur wenig studiert worden. Grund hierfür ist, dass die Methoden, die für die Messung der Fließgeschwindigkeit in anderen Geweben etabliert sind, nur schwer im Bereich des Knochengewebes angewendet werden können [139]. Der Goldstandard für die Messung der Fließgeschwindigkeit im Knochen ist die Messung mit radioaktiven Mikrokugeln (microspheres) [139]. Aber auch Positronen-Emissions-Tomographie, Geschwindigkeitsmessung via Laser und Ultraschall-Doppler sowie kurzweiliger Infrarotspektroskopie können verwendet werden [139]. Wie auch in anderen Geweben gibt es im Knochen zuführende und ableitende Blutgefäße sowie das mikrovaskuläre Netzwerk aus Kapillaren und Sinusoiden. Dennoch gibt es in der Klinik kein etabliertes System zu Messung der Fließgeschwindigkeit im Knochen. Gründe hierfür sind die große hohe Anzahl an verschiedenartigen Knochen (206 Stück), die von Knochen zu Knochen verschiedenen zuführenden Arterien- und abführenden Venensysteme sowie die unterschiedliche Zusammensetzung von

jedem einzelnen Knochen hinsichtlich des Anteils an kortikalem Knochen, spongiösem Knochen und Knochenmark [139]. Im Falle eines Knochenbruchs oder der Einbringung von Implantaten können Gefäße beschädigt werden. In diesem Fall ist die Durchblutung des Knochengewebes zusätzlich gestört und verändert. Auch durch die Verwendung verschiedenartiger Implantate wird der Blutfluss verschiedenartig verändert. Eine Bohrung für die Implantation eines Marknagels beeinträchtigt z.B. die medulläre Blutzirkulation, während die Fixierung mit einer Platte die Blutzirkulation in der Knochenhaut beeinträchtigt [139]. Dies bietet alles erschwerende Bedingungen für die Entwicklung einer an die *in vivo*-Situation angepassten Fließgeschwindigkeit. Die Fließgeschwindigkeiten des Blutes im Knochen sind zudem in verschiedenen Tierarten und damit auch im Vergleich zum Menschen unterschiedlich [7]. Eine Übertragung von Ergebnissen aus Tiermodellen auf den Menschen ist daher schwierig und sollte immer auch den Faktor der unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten berücksichtigen.

Hinsichtlich des Bioreaktoraufbaus sollte in zukünftigen Arbeiten eine Abfang-Vorrichtung wie z.B. ein Sieb integriert werden, um degradationsbedingt herausgelöste Magnesiummaterial-Teilchen abzufangen und damit ein Verstopfen der Schläuche zu verhindern. Dies ist auch für langsam degradierende Materialien notwendig, da die Anwendung des Bioreaktors insbesondere im weiteren Verlauf der Implantatentwicklung sinnvoll ist für längere Kultivierungszeiten (> 30 Tage) von Zellen auf den Prüfmaterialien.



## 7 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Die Wahl des biochemischen Assays für die quantitative Messung der Zytotoxizität sollte abhängig von der Kontaktart getroffen werden. Für Direkte Kontakttests ist die Lebend/Tot-Vitalfärbung das Mittel der Wahl. Für Extrakttests können sowohl die Tetrazolium-basierten Assays als auch die Lebend/Tot-Vitalfärbung verwendet werden. Im Falle der Verwendung eines Tetrazolium-basierten Assays dürfen allerdings keine Präzipitate, Magnesiummaterialpartikel oder Extrakte in Kontakt mit dem Tetrazolium sein. Die Extrakte sollten vor der Zugabe von Tetrazolium durch frisches Medium ersetzt werden.

Für die *in vitro*-Prüfung der Zytotoxizität müssen Prüfmaterialien entweder mit dem Extrakttest oder dem Direkten Kontakttest untersucht werden. Der Extrakttest nach ISO 10993:5 und 10993:12 ist für die Ermittlung der Zytotoxizität von Magnesiummaterialien grundsätzlich geeignet (Tabelle 14). Allerdings kann es durch eine legierungsabhängige schnelle Degradation der Magnesiummaterialien zu einem starken Anstieg der Osmolalität kommen kann. Um Falsch-Negativ-Ergebnisse zu vermeiden, die durch einen osmotischen Schock der Zellen entstehen könnten, sollten die Extrakte soweit verdünnt werden, dass die Osmolalität der Extrakte nicht mehr signifikant von der Osmolalität des Kontrollmediums abweicht. Im Falle des in dieser Arbeit verwendeten Kontrollmediums sollte die Osmolalität der Extrakte der Prüfmaterialien in jedem Fall niedriger sein als 0,4 Osmol/kg.

*Tabelle 14: Dargestellt ist die Eignung der Prüfmethode (Extrakttest und Direkter Kontakttest) in Abhängigkeit vom Degradationsverhalten der Prüfmaterialien. Die Mg0,6Ca-Legierung steht für eine langsamer degradierende Legierung und war nach dreitägiger Inkubation in Zellkulturmedium noch intakt, während die schneller degradierenden cpMg- und Mg6Ag-Materialien innerhalb dieser dreitägigen Inkubation schon sichtbaren Zerfall zeigten.*

	Mg0,6Ca	cpMg	Mg6Ag
Intaktheit des Prüfmaterials	> 3 Tage	< 3 Tage	< 3 Tage
Prüfmethode:			
Extrakttest	Geeignet	Geeignet	Geeignet
Direkter Kontakttest Variante 1	Nicht geeignet	Nicht geeignet	Nicht geeignet
Direkter Kontakttest Variante 2	Geeignet	Nicht geeignet	Nicht geeignet
Direkter Kontakttest Variante 3	Geeignet	Nicht geeignet	Nicht geeignet

Im Fall der Direkten Kontakttests muss unterschieden werden, ob die Legierungen schnell oder langsam degradieren. Prüfmaterialien, die innerhalb der dreitägigen Inkubation in Zellkulturmedium bereits sichtbare Zerfallserscheinungen zeigen, werden in dieser Arbeit als schnell degradierend bezeichnet. Prüfmaterialien, die nach diesen drei Tagen noch intakt sind, werden den langsam degradierenden Materialien zugeordnet. Im Fall schnell abbauender Materialien, die in der Regel auch für eine Implantatentwicklung nicht in Frage kämen, kann keine der drei in

dieser Arbeit untersuchten Varianten herangezogen werden (Tabelle 14). Bei langsam abbauenden Legierungen sind alle Varianten prinzipiell geeignet. Jedoch weist Variante 1 aufgrund des Versuchsaufbaus zu viele systematische Fehler auf und wurde deswegen verworfen. Variante 2 und 3 können für die Testung von korrosionsstabileren Magnesiummaterialien verwendet werden (Tabelle 14). Der hier erstmalig erprobte Bioreaktor ermöglichte zudem eine dynamische Kultivierung, mit der der pH-Wert auf physiologische neutrale Werte gebracht und stabilisiert werden konnte. Inwieweit der Abtransport von Degradationsprodukten und die Erneuerung des Mediums die lokale Erhöhung von Osmolalität und pH-Wert vermieden haben könnte, war mit diesem Aufbau nicht messbar. Die Osmolalität in den Vorratsflaschen stieg messbar, was auf einen Abtransport von Degradationsprodukten hinweist. Eine Publikation von Staiger et al., die im Rahmen des „2nd Symposium on Biodegradable Metals“ entstand, zeigt die große Hoffnung, dass ein Bioreaktorsystem zu physiologischeren und der *in vivo*-Situation ähnlicheren Bedingungen führen könnte [138]. Die Ergebnisse dieser Arbeit führen allerdings zu der Frage, ob ein Bioreaktorsystem wirklich eine Verbesserung der Kultivierungsbedingungen darstellt. Der Mediumfluss führte wie erhofft zu einer Senkung des pH-Wertes und möglicherweise zu einem Abtransport von Degradationsprodukten. Allerdings führte diese kontinuierliche Erneuerung des Chloridionen-reichen Zellkulturmediums aufgrund der niedrigen physiologischen pH-Werte, dem Abtransport von Degradationsprodukten einer kontinuierlich hohen Chloridionenkonzentration auch zu einer Beschleunigung der Korrosionsaktivität der Magnesiummaterialien, die der optimalen Adhäsion von Zellen entgegenstand. Daher ist fraglich, ob ein Bioreaktor tatsächlich eine Verbesserung der Kultivierungsbedingungen und Annäherung an das *in vivo*-System darstellt. Die Beschleunigung der Korrosion basiert auf der für das Zellkulturmedium frei zugänglichen Oberfläche der Prüfmaterialien. Im Menschen oder im Tiermodell ist das Implantat im Knochen oder Bindegewebe eingebettet und somit nicht mit seiner gesamten Oberfläche dem Blutstrom ausgesetzt. In zukünftigen Arbeiten sollte daher untersucht werden, ob eine Einbettung der Zellen und des Magnesiumprüfmaterial in eine Matrix wie z.B. Alginate die Situation verbessert und der Bioreaktor damit die erhoffte Verbesserung der Kultivierungsbedingungen der Zellen im Kontakt mit Magnesiumprüfmaterialien ermöglicht. In jedem Fall sollte der Bioreaktor für zukünftige Arbeiten noch erweitert werden. Eine Fließzelle mit integrierter Messtechnik zur Online-Messung von Fließgeschwindigkeit, pH-Wert, Osmolalität und Temperatur, sowie dem Glucose-, Laktat-, Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt ist empfehlenswert, um die notwendigen Parameter besser messen, regulieren und auswerten zu können.

Für die Testung von Biomaterialien empfiehlt die ISO Norm die Anwendung von Zelllinien [7, 13]. Allerdings vertrugen primär isolierte Osteoblasten in allen durchgeführten Tests deutlich höhere Konzentrationen an Magnesiumionen und Magnesiumextrakten als die Zelllinie MG-63. In Gegenwart von Magnesiumchloridsalz und verdünnten Magnesiumextrakten waren Osteoblasten

deutlich viabler, ausgestreckter und besser an der Zellkulturplastik adhäriert als die Zelllinie MG-63. Auch vertrugen die Osteoblasten deutlich höhere Osmolalitäten. Der positive Einfluss von zusätzlich zugeführtem Magnesium auf primär isolierte Osteoblasten sollte in zukünftigen Arbeiten weiter untersucht werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass unphysiologisch hohe extrazelluläre Magnesiumkonzentrationen die Proliferation und Redifferenzierung von Chondrozyten (Knorpelzellen) fördern [140]. Tierversuche zeigten zudem ein verstärktes Knochenwachstum bei der Verwendung von Magnesiumimplantaten gegenüber anderen Materialien, unabhängig von der verwendeten Legierung [8, 10, 70, 141]. Auch für die Anwendung als Implantatmaterial im Menschen wurde eine Aktivierung der Knochenheilung beschrieben [53-55]. Falls solch ein positiver Effekt von Magnesium auch bei *in vitro*-Untersuchungen für primär isolierte Osteoblasten nachweisbar wäre, sollte in zukünftigen *in vitro*-Zytotoxizitätsprüfungen deren zusätzliche Anwendung neben Zelllinien in Betracht gezogen werden. Aufgrund dessen, dass die Toleranz der primären Osteoblasten hinsichtlich hoher Magnesiumkonzentrationen, Osmolalitäten, pH-Werten so stark von der der MG-63-Zellen abwich, sollte in zukünftigen Arbeiten zudem überprüft werden, ob es notwendig ist, eine der von der ISO-Norm empfohlenen Fibroblasten-Zelllinien in die Untersuchungen miteinzubeziehen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Standardverfahren nach Normen für die Prüfung der Zytotoxizität von Magnesiummaterialien geeignet sind, wenn die in dieser Arbeit dargestellten Lösungsvorschläge beachtet werden.



## 8 LITERATUR

1. M.P. Staiger, A.M. Pietak, J. Huadmai, und G. Dias. "Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review". *Biomaterials*, Vol. 27(9), S. 1728-1734, 2006.
2. C. Krettek und P. Mommsen. "Implant removal after intramedullary osteosyntheses. Literature review, technical details, and tips and tricks". *Unfallchirurg*, Vol. 115(4), S. 299-314, 2012.
3. E.K. Tschegg, R.A. Lindtner, V. Doblhoff-Dier, S.E. Stanzl-Tschegg, G. Holzlechner, C. Castellani, T. Imwinkelried, und A. Weinberg. "Characterization methods of bone-implant-interfaces of bioresorbable and titanium implants by fracture mechanical means". *J Mech Behav Biomed Mater*, Vol. 4(5), S. 766-775, 2011.
4. F. Witte, T. Calliess, und H. Windhagen. "Degradable synthetische Implantatmaterialien". *Der Orthopäde*, Vol. 37, S. 125-130, 2008.
5. G.O. Hofmann. "Biodegradable implants in traumatology: a review on the state-of-the-art". *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, Vol. 114(3), S. 123-132, 1995.
6. J. Wolff, "Das Gesetz der Transformation der Knochen". Berlin: Hirschwald, 152 Seiten, 1892.
7. F. Witte, N. Hort, C. Vogt, S. Cohen, K.U. Kainer, R. Willumeit, und F. Feyerabend. "Degradable biomaterials based on magnesium corrosion". *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, Vol. 12(5-6), S. 63-72, 2008.
8. F. Witte, V. Kaese, H. Haferkamp, E. Switzer, A. Meyer-Lindenberg, C.J. Wirth, und H. Windhagen. "In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response". *Biomaterials*, Vol. 26(17), S. 3557-3563, 2005.
9. E. Zhang, L. Xu, G. Yu, F. Pan, und K. Yang. "In vivo evaluation of biodegradable magnesium alloy bone implant in the first 6 months implantation". *J Biomed Mater Res A*, Vol. 90(3), S. 882-893, 2009.
10. L. Xu, G. Yu, E. Zhang, F. Pan, und K. Yang. "In vivo corrosion behavior of Mg-Mn-Zn alloy for bone implant application". *J Biomed Mater Res A*, Vol. 83(3), S. 703-711, 2007.
11. F.I. Wolf und A. Cittadini. "Chemistry and biochemistry of magnesium". *Molecular Aspects of Medicine*, Vol. 24, S. 3-9, 2003.
12. W. Hartig, H.K. Biesalsky, W. Druml, P. Fürst, und A. Weimann, "Ernährung- und Infusionstherapie: Standards für Klinik, Intensivstation und Ambulanz". Thieme Verlag, 261, 2004.
13. ISO. "Biological evaluation of medical devices: Part 5 - Tests for in vitro cytotoxicity". Europäische Norm (EN) 10993-5:2009, ISO: Schweiz. 2009.
14. ASTM. "Standard Practice for Direct Contact Cell Culture Evaluation of Materials for Medical Devices". ASTM Norm F813-07, ASTM: West Conshohocken, PA. 2003.

## LITERATUR

---

15. F. Witte, J. Fischer, J. Nellesen, H.A. Crostack, V. Kaese, A. Pisch, F. Beckmann, und H. Windhagen. "In vitro and in vivo corrosion measurements of magnesium alloys". *Biomaterials*, Vol. 27(7), S. 1013-1018, 2006.
16. B. GEK, "BARMER GEK Gesundheitsreport 2012". 2012.
17. B.G. Krankenkasse, "BARMER GEK Report Krankenhaus", in Buch "BARMER GEK Report Krankenhaus", 2012.
18. D. Forschung, "DAK Gesundheitsreport 2012". 2012.
19. T. Krankenkasse, "Gesundheitsreport 2011 - Gesundheitliche Veränderungen bei jungen Erwerbspersonen und Studierenden", in Buch "Gesundheitsreport 2011 - Gesundheitliche Veränderungen bei jungen Erwerbspersonen und Studierenden", 2011.
20. M. Nöthen und K. Böhm, "Heft 48 - Krankheitskosten", in Buch "Heft 48 - Krankheitskosten", R.K. Institut und S. Bundesamt: Berlin, 2009.
21. A. Husain, A.N. Pollak, H.D. Moehring, S.A. Olson, und M.W. Chapman. "Removal of intramedullary nails from the femur: a review of 45 cases". *J Orthop Trauma*, Vol. 10(8), S. 560-562, 1996.
22. R. Miller, S.E. Renwick, T.A. DeCoster, P. Shonnard, und F. Jabczynski. "Removal of intramedullary rods after femoral shaft fracture". *J Orthop Trauma*, Vol. 6(4), S. 460-463, 1992.
23. C.C. Wu und C.H. Shih. "Refracture after removal of a static-locked femoral nail". *Acta Orthop Scand*, Vol. 66(3), S. 296-298, 1995.
24. T.O. Boerger, G. Patel, und J.P. Murphy. "Is routine removal of intramedullary nails justified". *Injury*, Vol. 30, S. 79-81, 1999.
25. T.F. Slongo. "The potential for bioresorbable implants in paediatric fractures". *Injury*, Vol. 33 Suppl 2, S. B84-87, 2002.
26. P.G. Hope, D.M. Williamson, C.J. Coates, und W.G. Cole. "Biodegradable pin fixation of elbow fractures in children. A randomised trial". *Journal of Bone and Joint Surgery: British Volume*, Vol. 73(6), S. 965-968, 1991.
27. C. Sanger, A. Soto, F. Mussa, M. Sanzo, L. Sardo, P.A. Donati, G. Di Pietro, B. Spacca, F. Giordano, und L. Genitori. "Maximizing results in craniofacial surgery with bioresorbable fixation devices". *Journal of Craniofacial Surgery*, Vol. 18(4), S. 926-930, 2007.
28. B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, und J.E. Lemons, "Biomaterials science an introduction to materials in medicine". 2. ed.: Elsevier, 851 Seiten, 2004.
29. G.O. Hofmann. "Biologisch abbaubare Knochenimplantate". *Spektrum der Wissenschaft*, Vol. 2, 1997.
30. F. Barrere, C.A. van Blitterswijk, und K. de Groot. "Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics". *Int J Nanomedicine*, Vol. 1(3), S. 317-332, 2006.
31. L.L. Hench. "The story of Bioglass". *Journal Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 17(11), S. 967-978, 2006.
32. E.J. Bergsma, F.R. Rozema, R.R. Bos, und W.C. de Bruijn. "Foreign body reactions to resorbable poly(L-lactide) bone plates and screws used for the fixation of

- unstable zygomatic fractures*". Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Vol. 51(6), S. 666-670, 1993.
33. O. Bostman, E. Hirvensalo, S. Vainionpää, K. Vihtonen, P. Tormala, und P. Rokkanen. "Degradable polyglycolide rods for the internal fixation of displaced bimalleolar fractures". Int Orthop, Vol. 14(1), S. 1-8, 1990.
  34. G.J. Buijs, B. Stegenga, und R.R. Bos. "Efficacy and safety of biodegradable osteofixation devices in oral and maxillofacial surgery: a systematic review". J Dent Res, Vol. 85(11), S. 980-989, 2006.
  35. P. Simamora und W. Chern. "Poly-L-lactic acid: an overview". Journal of Drugs in Dermatology, Vol. 5(5), S. 436-440, 2006.
  36. K.E. Rehm, H.J. Helling, und C. Gatzka. "Neue Entwicklungen beim Einsatz resorbierbarer Implantate". Der Orthopäde, Vol. 26, S. 489-497, 1997.
  37. A. Prokop, H.J. Helling, U. Hahn, C. Udomkaewkanjana, und K.E. Rehm. "Biodegradable implants for Pipkin fractures". Clin Orthop Relat Res, Vol. (432), S. 226-233, 2005.
  38. M.B. Mueller, H.H. Fredrich, E. Steinhauser, U. Schreiber, A. Arians, und A.B. Imhoff. "Biomechanical evaluation of different suture anchors for the stabilization of anterior labrum lesions". Arthroscopy, Vol. 21(5), S. 611-619, 2005.
  39. T.R. Arnett. "Extracellular pH regulates bone cell function". The Journal of Nutrient, Vol. 138(2), S. 415-418, 2008.
  40. C. Schiller und M. Epple. "Carbonated calcium phosphates are suitable pH-stabilising fillers for biodegradable polyesters". Biomaterials, Vol. 24(12), S. 2037-2043, 2003.
  41. P. Chang. "Polymer implant materials with improved X-ray opacity and biocompatibility". Biomaterials, Vol. 2(3), S. 151-155, 1981.
  42. C. Janning. "Auswirkungen eines Magnesiumkorrosionsproduktes (Mg(OH)<sub>2</sub>) ausdegradierbaren Magnesiumimplantaten auf den umliegenden, spongiösen Knochen im Kaninchenmodell". PhD, 231 Seiten, 2008.
  43. S. Gogolewski. "Bioresorbable polymers in trauma and bone surgery". Injury, Vol. 31 Suppl 4, S. 28-32, 2000.
  44. E.C. Huse. "A New Ligature". Chicago Medical Journal and Examiner, Vol. August, S. 171-172, 1878.
  45. E. Payr. "Beiträge zur Technik der Blutgefäß- und Nerven-naht nebst Mittheilungen über die Verwendung eines resorbierbaren Metalles in der Chirurgie". Archiv für Klinische Chirurgie, Vol. 62, S. 67-93, 1900.
  46. E. Payr. "Weitere Mittheilungen über die Verwendung des Magnesiums bei der Naht der Blutgefäße". Archiv für Klinische Chirurgie, Vol. 64, S. 726-740, 1901.
  47. V. Chlumsky, "Beiträge zur Darmknopffrage", in Buch "Beiträge zur Darmknopffrage" Fischer: Jena. S. 416-451, 1907.
  48. E. Payr. "Über die Verwendung von Magnesium zur Behandlung von Blutgefäßerkrankungen". Deutsche Zeitung für Chirurgie, Vol. 63, S. 903, 1902.
  49. F. Witte. "The history of biodegradable magnesium implants: a review". Acta Biomater, Vol. 6(5), S. 1680-1692, 2010.

## LITERATUR

---

50. A. Lambotte. "L'utilisation du magnésium comme matériel perdu dans l'ostéosynthèse". Bull Mém Soc Nat Cir, Vol. 28, S. 1325-1334, 1932.
51. J. Verbrugge. "La tolerance du tissu osseux vis-a-vis du magnesium metallique". Presse Med, Vol. 55, 1933.
52. E.D. McBride. "Absorbable metal in bone surgery; a further report on the use of magnesium alloys". The Journal of the American Medical Association, Vol., S. 2464-2467, 1938.
53. E.D. McBride. "Magnesium screw and nail transfixion in fractures". Southern Medical Journal, Vol. 31(5), S. 508-515, 1938.
54. J. Verbrugge. "Le Matériel Métallique résorbable en chirurgie osseuse". La Presse medicale, Vol., S. 460-465, 1934.
55. J. Verbrugge. "L'utilisation du magnésium dans le traitement chirurgical des fractures". Academie du Chirurgie, Vol., S. 813-823, 1937.
56. P. Rostock. "Ist das Magnesium als Naht- und Schienungsmaterial für Knochenoperationen geeignet?". Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery, Vol. 38(3), S. 486-492, 1937.
57. D. Schranz, P. Zartner, I. Michel-Behnke, und H. Akinturk. "Bioabsorbable metal stents for percutaneous treatment of critical recoarctation of the aorta in a newborn". Catheter Cardiovasc Interv, Vol. 67(5), S. 671-673, 2006.
58. P. Zartner, R. Cesnjevar, H. Singer, und M. Weyand. "First successful implantation of a biodegradable metal stent into the left pulmonary artery of a preterm baby". Catheter Cardiovasc Interv, Vol. 66(4), S. 590-594, 2005.
59. R. Erbel, D. Bose, M. Haude, I. Kordish, S. Churzidze, N. Malyar, T. Konorza, und S. Sack. "[Absorbable coronary stents. New promising technology]". Herz, Vol. 32(4), S. 308-319, 2007.
60. R. Erbel, C. Di Mario, J. Bartunek, J. Bonnier, B. de Bruyne, F.R. Eberli, P. Erne, M. Haude, B. Heublein, M. Horrigan, C. Ilesley, D. Bose, J. Koolen, T.F. Luscher, N. Weissman, und R. Waksman. "Temporary scaffolding of coronary arteries with bioabsorbable magnesium stents: a prospective, non-randomised multicentre trial". Lancet, Vol. 369(9576), S. 1869-1875, 2007.
61. M.E. Maguire und J.A. Cowan. "Magnesium chemistry and biochemistry". BioMetals, Vol. 15, S. 203-210, 2002.
62. J.A. Cowan, "Introduction to the biological chemistry of magnesium ion", in Buch "Introduction to the biological chemistry of magnesium ion", J.A. Cowan, VCH. S. 1-23, 1995.
63. J.R. Marier. "Dietary magnesium and drinking water: Effects on human health status". Metal Ions in Biological Systems, Vol. 26, S. 85-104, 1990.
64. H. Meyer und J. Zentek. "Magnesium and animal nutrition". Metal Ions in Biological Systems, Vol. 26, S. 57-83, 1990.
65. E. Aghion, G. Levy, und S. Ovadia. "In vivo behavior of biodegradable Mg-Nd-Y-Zr-Ca alloy". J Mater Sci Mater Med, Vol. 23(3), S. 805-812, 2012.
66. I. Braceras, M.A. De Maeztu, J.I. Alava, und C. Gay-Escoda. "In vivo low-density bone apposition on different implant surface materials". Int J Oral Maxillofac Surg, Vol. 38(3), S. 274-278, 2009.

67. L. Le Guéhennec, A. Soueidan, P. Layrolle, und Y. Amouriq. "*Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration*". Dental Materials, Vol. 23, S. 844–854, 2007.
68. M. Papakyriacou, H. Mayer, C. Pypen, H. Plenck Jr, und S. Stanzl- Tschegg. "*Effects of surface treatments on high cycle corrosion fatigue of metallic implant materials*". International Journal of Fatigue, Vol. 22, S. 873–886, 2000.
69. A. Piattelli, L. Manzon, A. Scarano, M. Paolantonio, und M. Piattelli. "*Histologic and histomorphometric analysis of the bone response to machined and sandblasted titanium implants: an experimental study in rabbits*". International Journal of Oral and Maxillofacial Implants, Vol. 13, S. 805–810, 1998.
70. C. Janning, E. Willbold, C. Vogt, J. Nellesen, A. Meyer-Lindenberg, H. Windhagen, F. Thorey, und F. Witte. "*Magnesium hydroxide temporarily enhancing osteoblast activity and decreasing the osteoclast number in peri-implant bone remodelling*". Acta Biomater, Vol. 6(5), S. 1861-1868, 2010.
71. C. Müller Mai, "*Bioaktive Granulate in der Unfallchirurgie*". München: VNM Science Publishing, 2003.
72. E. Ghali, W. Dietzel, und K.U. Kainer. "*General and Localized Corrosion of Magnesium Alloys: A Critical Review*". Journal of Materials Engineering and Performance, Vol. 13(1), S. 7-23, 2004.
73. Z. Li, X. Gu, S. Lou, und Y. Zheng. "*The development of binary Mg-Ca alloys for use as biodegradable materials within bone*". Biomaterials, Vol. 29, S. 1329-1344, 2008.
74. R. Ambat, N.N. Aung, und W. Zhou. "*Studies on the influence of chloride ion and pH on the corrosion and electrochemical behaviour of AZ91D magnesium alloy*". Journal of Applied Electrochemistry, Vol. 30, S. 865-874, 2000.
75. W.D. Müller, M. Fernandez Lorenzo de Mele, M.L. Nascimento, und M. Zeddies. "*Degradation of magnesium and its alloys: dependence on the composition of the synthetic biological media*". Journal of Biomedical Materials Research Part A, Vol. 90A, S. 487-495, 2008.
76. M.M. Avedesian und H. Baker, "*Magnesium and Magnesium Alloys*", in Buch "*Magnesium and Magnesium Alloys*" ASM International: Materials Park, Ohio, USA. S. 350 Seiten, 1999.
77. W.D. Mueller, M. Lucia Nascimento, und M.F. Lorenzo de Mele. "*Critical discussion of the results from different corrosion studies of Mg and Mg alloys for biomaterial applications*". Acta Biomater, Vol. 6(5), S. 1749-1755, 2010.
78. G. Song, A. Atrens, D. Stjohn, J. Nairn, und Y. Li. "*Electrochemical corrosion of pure magnesium in 1 N NaCl*". Corrosion Science, Vol. 39, S. 855-875, 1997.
79. C. Cai, Z. Zhang, Z.L. Wei, J.F. Yang, und J.F. Li. "*Electrochemical and corrosion behaviors of pure Mg in neutral 1.0% NaCl solution*". Transaction of Nonferrous Metals Society of China, Vol. 22, S. 970-976, 2012.
80. G.L. Song und A. Atrens. "*Corrosion mechanisms of magnesium alloys*". Advanced Engineering Materials, Vol. 1, S. 11-33, 1999.

## LITERATUR

---

81. B.A. Shaw, "Corrosion resistance of magnesium alloys", in Buch "Corrosion resistance of magnesium alloys", D. Stephen, ASM International: Materials Park, Ohio, USA, 2003.
82. M. Bohner und J. Lemaitre. "Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?". *Biomaterials*, Vol. 30(12), S. 2175-2179, 2009.
83. J. Fischer, M.H. Prosenc, M. Wolff, N. Hort, R. Willumeit, und F. Feyerabend. "Interference of magnesium corrosion with tetrazolium based cytotoxicity assays". *Acta Biomater*, Vol., 2009.
84. A. Yamamoto und S. Hiromoto. "Effect of inorganic salts, amino acids and proteins on the degradation of pure magnesium in vitro". *Material Science and Engineering Part C*, Vol. 29, S. 1559-1568, 2009.
85. Y. Xin, T. Hu, und P.K. Chu. "Influence of Test Solutions on In Vitro Studies of Biomedical Magnesium Alloys". *Journal of The Electrochemical Society*, Vol. 157(7), S. C238-C243, 2010.
86. T. Kokubo und H. Takadama. "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?". *Biomaterials*, Vol. 27(15), S. 2907-2915, 2006.
87. L. Yang, N. Hort, R. Willumeit, und F. Feyerabend. "Effects of corrosion environment and proteins on magnesium corrosion". *Corrosion Engineering, Science and Technology*, Vol. 47(5), S. 335-339, 2012.
88. R. Rettig und S. Virtanen. "Time-dependent electrochemical characterization of the corrosion of a magnesium rare-earth alloy in simulated body fluids". *J Biomed Mater Res A*, Vol. 85, S. 167-175, 2008.
89. C. Liu, Y. Xin, X. Tian, und P.K. Chu. "Degradation susceptibility of surgical magnesium alloy in artificial biological fluid containing albumin". *Journal of Materials Research*, Vol. 22, S. 1806-1814, 2007.
90. C.L. Liu, Y.J. Wang, R.C. Zeng, X.M. Zhang, W.J. Huang, und P.K. Chu. "In vitro corrosion degradation behaviour of Mg-Ca alloy in the presence of albumin". *Corrosion Science*, Vol. 52, S. 3341-3347, 2010.
91. K. Merritt, S.A. Brown, und N.A. Sharkey. "The binding of metal salts and corrosion products to cells and proteins in vitro". *J Biomed Mater Res*, Vol. 18(9), S. 1005-1015, 1984.
92. R. Willumeit, J. Fischer, F. Feyerabend, N. Hort, U. Bismayer, S. Heidrich, und B. Mihailova. "Chemical surface alteration of biodegradable magnesium exposed to corrosion media". *Acta Biomater*, Vol. 7(6), S. 2704-2715, 2011.
93. D. Tie, F. Feyerabend, N. Hort, R. Willumeit, und D. Hoeche. "XPS Studies of Magnesium Surfaces after Exposure to Dulbecco's Modified Eagle Medium, Hank's Buffered Salt Solution, and Simulated Body Fluid". *Advanced Engineering Materials*, Vol. 12(12), S. B699-B704, 2010.
94. R. Willumeit, F. Feyerabend, und N. Huber. "Magnesium degradation as determined by artificial neural networks". *Acta Biomater*, Vol. epub ahead of print, 2013.
95. W.D. Mueller. "Electrochemical characterization of metallic biomaterials with help of Mini Cell System (MCS)". *Habilitation*, 2009.

96. ISO. "Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 1: Beurteilung und Prüfung". Europäische Norm (EN) 10993-1:2003, Deutsches Institut für Normung: Berlin, Deutschland. 2003.
97. ISO. "Biological evaluation of medical devices - Part 12: Samples preparations and reference materials.". Europäische Norm (EN) 10993-12:2007, ISO: Schweiz. 2007.
98. T. Mosmann. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". J Immunol Methods, Vol. 65(1-2), S. 55-63, 1983.
99. N.W. Roehm, G.H. Rodgers, S.M. Hatfield, und A.L. Glasebrook. "An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT". J Immunol Methods, Vol. 142(2), S. 257-265, 1991.
100. H. Mueller, M.U. Kassack, und M. Wiese. "Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines". J Biomol Screen, Vol. 9(6), S. 506-515, 2004.
101. T. Lindl, "Zell- und Gewebekultur". Spektrum, 2002.
102. J.A. Gallagher. "Human osteoblast culture". Methods Mol Med, Vol. 80, S. 3-18, 2003.
103. H.P. Latscha, G.W. Linti, und H.A. Klein, "Analytische Chemie: Chemie - Basiswissen III". Springer, 513, 2003.
104. P. Leonhard, R. Pepelnik, A. Prange, N. Yamada, und T. Yamada. "Analysis of diluted sea-water at the ng L<sup>-1</sup> level using an ICP-MS with an octopole reaction cell". Journal of Analytical Atomic Spectrometry, Vol. 17(3), S. 189-196, 2002.
105. S. Fahrenholtz, S. Griesel, D. Pröfrock, und A. Kakuschke. "Essential and non-essential elements in tissues of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded on the coasts of the North and Baltic Seas between 2004-2006". Journal of Environmental Monitoring, Vol. 11(5), S. 1107-1113, 2009.
106. S. Meyer. "Konstruktion und Betrieb eines Bioreaktors zur 3D-Kultivierung von tierischen und humanen Zellen für in vitro Toxizitätstests". 2009.
107. P.C. Ferreira, A. Piai Kde, A.M. Takayanagui, und S.I. Segura-Munoz. "Aluminum as a risk factor for Alzheimer's disease". Revista Latino-Americana de Enfermagem, Vol. 16(1), S. 151-157, 2008.
108. S.S.A. El-Rahman. "Neuropathology of aluminium toxicity in rats". Pharmacological Research, Vol. 47, S. 189-194, 2003.
109. P. De Sole, C. Rossi, M. Chiarpotto, G. Ciasca, B. Bocca, A. Alimonti, A. Bizzarro, C. Rossi, und C. Masullo. "Possible relationship between Al/ferritin complex and Alzheimer's disease". Clinical Biochemistry, Vol. 46(1-2), S. 89-93, 2013.
110. F. Feyerabend, J. Fischer, J. Holtz, F. Witte, R. Willumeit, H. Drucker, C. Vogt, und N. Hort. "Evaluation of short-term effects of rare earth and other elements used in magnesium alloys on primary cells and cell lines". Acta Biomater, Vol. 6(5), S. 1834-1842, 2010.
111. J. Fischer, F. Feyerabend, N. Hort, K.U. Kainer, A. Schreyer, und R. Willumeit, "Cytotoxic and immunological effects of magnesium alloy elements on cells", in Buch

- "Cytotoxic and immunological effects of magnesium alloy elements on cells"* Wiley-VCH, 2009.
112. A. Drynda, T. Hassel, R. Hoehn, A. Perz, F.W. Bach, und M. Peuster. *"Development and biocompatibility of a novel corrodible fluoride-coated magnesium-calcium alloy with improved degradation kinetics and adequate mechanical properties for cardiovascular applications"*. J Biomed Mater Res A, Vol. 93(2), S. 763-775, 2010.
  113. N. Erdmann. *"Untersuchung zur Entwicklung der Haltekraft von degradablen Schrauben aus einer Magnesiumbasislegierung (MgCa<sub>0,8</sub>) nach ossärer Implantation im Vergleich zu Stahlschrauben (S316L) sowie zu deren Biokompatibilität im periimplantären Weichteilgewebe im Kaninchenmodell"*. PhD, 2010.
  114. N. von der Hoh, A. Krause, C. Hackenbroich, D. Bormann, A. Lucas, und A. Meyer-Lindenberg. *"Influence of different surface machining treatments of resorbable implants made from different magnesium-calcium alloys on their degradation--a pilot study in rabbit models"*. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, Vol. 113(12), S. 439-446, 2006.
  115. M. Thomann, C. Krause, D. Bormann, N. von der Höh, H. Windhagen, und A. Meyer-Lindenberg. *"Comparison of the resorbable magnesium alloys LAE442 und MgCa<sub>0.8</sub> concerning their mechanical properties, their progress of degradation and the bone-implant-contact after 12 months implantation duration in a rabbit model"*. Materialwissenschaft und Werkstofftechnik, Vol. 40, S. 82-87, 2009.
  116. R. Elsayed, N. Hort, M.A. Salgado-Ordorica, und K.U. Kainer. *"Magnesium Permanent Mold Castings Optimization"*. Materials Science Forum, Vol. 690, S. 65-68, 2011.
  117. M. Wolff, T. Ebel, und M. Dahms. *"Sintering of Magnesium"*. Advanced Engineering Materials, Vol. 12, S. 829-836, 2010.
  118. W.D. Mueller, C. Schoepf, M.L. Nascimento, A.C. Carvalho, M. Moisel, A. Schenk, F. Scholz, und K.P. Lange. *"Electrochemical characterisation of dental alloys: its possibilities and limitations"*. Anal Bioanal Chem, Vol. 381, S. 1520-1525, 2005.
  119. M.L. Nascimento, W.D. Mueller, A.C. Carvalho, und H. Tomas. *"Electrochemical characterization of cobalt-based alloys using the mini-cell-system"*. Dental Materials, Vol. 23(3), S. 369-373, 2007.
  120. J.L. York, L.C. Maddox, P. Zimniak, T.E. McHugh, und D.F. Grant. *"Reduction of MTT by glutathione S-transferase"*. Biotechniques, Vol. 25(4), S. 622-624, 626-628, 1998.
  121. D. Funk, H.H. Schrenk, und E. Frei. *"Serum albumin leads to false-positive results in the XTT and the MTT assay"*. Biotechniques, Vol. 43(2), S. 178, 180, 182 passim, 2007.
  122. M. Natarajan, S. Mohan, B.R. Martinez, M.L. Meltz, und T.S. Herman. *"Antioxidant compounds interfere with the 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide Cytotoxicity Assay"*. Cancer Detect Prev, Vol. 24(5), S. 405-414, 2000.

123. L. Peng, B. Wang, und P. Ren. "Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 45(2), S. 108-111, 2005.
124. T.P. Talorete, M. Bouaziz, S. Sayadi, und H. Isoda. "Influence of medium type and serum on MTT reduction by flavonoids in the absence of cells". *Cytotechnology*, Vol. 52(3), S. 189-198, 2006.
125. D.T. Vistica, P. Skehan, D. Scudiero, A. Monks, A. Pittman, und M.R. Boyd. "Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production". *Cancer Res*, Vol. 51(10), S. 2515-2520, 1991.
126. R. Chakrabarti, S. Kundu, S. Kumar, und R. Chakrabarti. "Vitamin A as an enzyme that catalyzes the reduction of MTT to formazan by vitamin C". *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol. 80(1), S. 133-138, 2000.
127. M.V. Berridge, A.S. Tan, K.D. McCoy, und R. Wang. "The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts". *Biochemica*, Vol. 4, S. 14-19, 1996.
128. N.A. Monteiro-Riviere, A.O. Inman, und L.W. Zhang. "Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line". *Toxicol Appl Pharmacol*, Vol. 234(2), S. 222-235, 2009.
129. J.A. Plumb, R. Milroy, und S.B. Kaye. "Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay". *Cancer Res*, Vol. 49(16), S. 4435-4440, 1989.
130. W. Luttmann, K. Bratke, M. Küpper, und D. Myrtek, "Der Experimentator Immunologie". München: Elsevier, 2006.
131. K. Falkner-Tränkle. "Untersuchungen zum Zelltod in eukaryotischen Zellpopulationen und Einzelzellen mittels Videomikroskopie und digitaler Bildanalyse". Doktorarbeit, 2001.
132. C. Küper, F.X. Beck, und W. Neuhofer. "Osmoadaptation of Mammalian Cells – An Orchestrated Network of Protective Genes". *Current Genomics*, Vol. 8, S. 209-218, 2007.
133. J. Fischer, D. Proefrock, N. Hort, R. Willumeit, und F. Feyerabend. "Improved Cytotoxicity Testing of Magnesium Materials". *Material Science and Engineering Part B*, Vol. 176(20), S. 1773-1777, 2011.
134. S. Nagel-Heyer, "Ingenieurtechnische Aspekte bei der Herstellung von dreidimensionalen Knorpel-Träger-Konstrukten". Norderstedt: Books on Demand GmbH, 2004.
135. A.W. Tilles, H. Baskaran, P. Roy, M.L. Yarmush, und M. Toner. "Effects of oxygenation and flow on the viability and function of rat hepatocytes cocultured in a microchannel flat-plate bioreactor". *Biotechnol Bioeng*, Vol. 73(5), S. 379-389, 2001.
136. E.F. Emley, "Principles of Magnesium technology". Oxford: Pergamon Press, XX, 1013 S., 1966.

## LITERATUR

---

137. W.F. Ng, K.Y. Chiu, und F.T. Cheng. "*Effect of pH on the in vitro corrosion rate of magnesium degradable implant material*". *Material Science and Engineering Part C*, Vol. 30(6), S. 898–903, 2010.
138. M.P. Staiger, F. Feyerabend, R. Willumeit, C.S. Sfeir, Y.F. Zheng, S. Virtanen, W.D. Müller, A. Atrens, M. Peuster, P.N. Kumta, D. Mantovani, und F. Witte. "*Summary of the panel discussions at the 2nd Symposium on Biodegradable Metals, Maratea, Italy, 2010*". *Materials Science and Engineering Part B*, Vol. 176, S. 1596– 1599, 2011.
139. I. McCarthy. "*The physiology of bone blood flow: a review*". *J Bone Joint Surg Am*, Vol. 88 Suppl 3, S. 4-9, 2006.
140. F. Feyerabend, F. Witte, M. Kammal, und R. Willumeit. "*Unphysiologically high magnesium concentrations support chondrocyte proliferation and redifferentiation*". *Tissue Eng*, Vol. 12(12), S. 3545-3556, 2006.
141. F. Witte, H. Ulrich, C. Palm, und E. Willbold. "*Biodegradable magnesium scaffolds: Part II: peri-implant bone remodeling*". *J Biomed Mater Res A*, Vol. 81(3), S. 757-765, 2007.