



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
Fachbereich Naturwissenschaftliche Technik

Herstellung, Charakterisierung und biologische Testung durch  
Metallspritzgießen hergestellter poröser Titanmaterialien

**Diplomarbeit**

Im Studiengang Medizintechnik

vorgelegt von  
Farida Ali

Hamburg  
April 2012

1. Gutachter: Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker (HAW-Hamburg)
2. Gutachter: Prof. Dr. Regine Willumeit (Helmholtz-Zentrum Geesthacht)

## Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Diplomarbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Hamburg, 23.04.2012

---

Unterschrift

Farida Ali

## Danksagung

Die vorliegende Diplomarbeit entstand in der Abteilung WPS des Instituts für Werkstoffforschung des Helmholtz-Zentrum Geesthacht.

Bei Frau Prof. Dr. Regine Willumeit möchte ich mich für die Betreuung meiner Arbeit seitens des Helmholtz-Zentrum Geesthacht bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker für die Betreuung seitens der Hochschule für angewandte Wissenschaften.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung WPS besonders Herrn Dr. Frank Feyerabend und Frau Dr. Bérengère Luthringer für die wissenschaftliche Betreuung und die stete Bereitschaft zur Unterstützung in allen Belangen dieser Arbeit bedanken.

Zudem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Werkstoffforschung, die mir durch kleine Hilfestellungen und Anregungen geholfen haben, diese Diplomarbeit entstehen zu lassen, bedanken.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Grundlagen .....</b>	<b>3</b>
2.1 Knochenzellen .....	3
2.2 Stammzellen .....	4
2.3 Verschiedene Differenzierungsmarker .....	4
2.4 Ti-6Al-4V.....	5
2.5 Poröses Titan als Implantat.....	6
2.6 MIM Verfahren .....	7
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>9</b>
3.1 Probenherstellung mittels MIM.....	9
3.2 Metallographische Probenpräparation.....	10
3.3 Mikroskopie.....	11
3.4 Geometrische Dichtebestimmung .....	11
3.5 Vorbereiten der Zellen.....	12
3.6 Adhäsion und Proliferation .....	14
3.7 Differenzierung der Zellen .....	16
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>23</b>
4.1 Charakterisierung der Porositäten der Proben .....	23
4.2 Gesamte Porengrößenverteilung .....	25
4.3 Biologische Charakterisierung der porösen Ti-6Al-4VProben.....	27
4.3.1 Initiale Adhäsion der Osteoblasten- und HUCPV-Zellen .....	27
4.3.2 Visualisierung der Zellkerne durch DAPI Färbung .....	27
4.3.3 Initiale Proliferation der Osteoblasten und HUCPV-Zellen .....	30
4.3.4 Parallelfärbung für Osteokalzin, Osteopontin und DAPI .....	31
4.3.5 ALP Produktion von Osteoblasten und HUCPV-Zellen .....	32
4.3.6 Osteokalzinproduktion der Osteoblasten und HUCPV-Zellen .....	33
4.3.7 RT-PCR .....	34

---

<b>5</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>36</b>
5.1	Porosität und Porengrößenverteilung.....	36
5.2	Initiale Zellviabilität der Zellen .....	37
5.3	Zelldifferenzierung .....	40
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>44</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>46</b>
	<b>Anhangsverzeichnis.....</b>	<b>50</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Entwicklung des Menschen.....	4
Abb. 2:	Lichtmikroskopische Aufnahme 20x von der Oberfläche der Ti-6Al-4V-Probe.....	23
Abb. 3:	REM-Aufnahme 20kv/200x/25mm von der Oberfläche der Ti-6Al-4V-Probe .....	24
Abb. 4:	Porengrößenverteilung der unterschiedlichen Ti-6Al-4V-Proben.....	25
Abb. 5:	Darstellung der unterschiedlichen Porositäten (Vol.-%) von Ti-6Al-4V .....	26
Abb. 6:	Initiale Adhäsion der Osteoblasten (A) und der HUCPV-Zellen (B) auf den verschiedenenTi-6Al-4V-Proben .....	27
Abb. 7:	DAPI-Färbung der Osteoblasten auf den unterschiedlichen Ti-6Al-4V-Proben nach 1 h, 2 h und 4 h Inkubation .....	28
Abb. 8:	DAPI-Färbung der HUCPV- Zellen auf den unterschiedlichen Ti-6Al-4V-Proben nach 1 h, 2 h und 4 h Inkubation .....	29
Abb. 9:	Initiale Proliferation der adhärierenden Osteoblasten (A) und HUCPV-Zellen (B) nach mehreren Tagen im Vergleich nach 1 h Inkubation.....	30
Abb. 10:	Parallelfärbung der Osteoblasten auf den unterschiedlich porösen Proben nach 4 Wochen.....	31
Abb. 11:	Parallelfärbung der HUCPV-Zellen auf den unterschiedlich porösen Ti-6Al-4V-Proben nach 4 Wochen.....	32
Abb. 12:	ALP-Synthese von Osteoblasten (A) und HUCPV-Zellen (B) nach 2, 3 und 4 Wochen zum Vergleich mit der Viabilität nach 15 Tagen.....	32
Abb. 13:	Osteokalzin-Produktion von Osteoblasten (A) und HUCPV-Zellen (B) nach 2, 3und 4 Wochen zum Vergleich mit der Viabilität nach 15 Tagen .....	33
Abb. 14:	Die Differenzierungsmarker ALP, BSP, cbfa1, col1, OC, OPG, OPN und RANKL normiert auf den endogenen Referenzgen GAPDH nach 2 Wochen (A), 3 Wochen (B) und 4 Wochen (C) Differenzierung.....	34

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Streckgrenze, Zugfestigkeit, Bruchdehnung und E-Modul von Implantatwerkstoffen.....	6
Tabelle 2: 96 Well Platte mit den Proben für den Versuch .....	17
Tabelle 3: Primersequenzen der verwendeten Marker für die PCR.....	21
Tabelle 4: Mechanische Eigenschaften von MIM-Ti-6Al-4V ermittelt durch Zugversuche .....	36

## Abkürzungsverzeichnis

$A_{260}$	Absorption bei 260 nm
A	Bruchdehnung
ALP	Alkalische Phosphatase
Aluminium	$\leq 45 \mu\text{m} +1 \% \text{ Al Probe}$
ANNOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
BSP	Bone Sialo Protein
$\beta$ -ME	beta-Mercaptoethanol
Cbfa1	core binding factor alpha 1
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
Col1	Kollagen Typ 1
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol Dihydrochloride (Fluoreszenzfarbstoff)
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
v	Volumenausdehnungskoeffizient
$\rho$ theoretisch	theoretische Dichte
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Didesoxy-Varianten des Nukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Komplexbildner)
EIGA	Electrode Induction melting Gas Atomization (Elektrode Induktionsschmelzen Gaszerstäubung)
ELI	Extra Low Interstitial(extrem niedrig interstitiell)
ELISA	Enzyme linked Immuno sorbent assay (Enzymimmunoassay)
E-Modul	Elastizitätsmodul
EtOH	Ethanol
FIB	Focus Ion Beam (Fokussierter Ionenstrahl)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate-Dehydrogenase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCL	Salzsäure
HF	Flusssäure
HNO <sub>3</sub>	Salpetersäure
HRP	Horse radish peroxidase(Enzym Meerrettichperoxidase)
HUCPV	Human umbilical cord perivascular cells (Nabelschnurstammzellen)
HV	Härteprüfung nach Vickers
MEM	Minimum Essential Medium

MG	Molekulargewicht
MIM	Metal Injection Moulding (Metallspritzguß)
Mischung	125-180 µm+ ≤ 45 µm
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
OB	Osteoblasten
OC	Osteokalzin
OD	Optische Dichte
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
OPS	Feinpoliersuspension
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
P/S	Penicillin/Streptomycin
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
REM	Rasterelektronenmikroskop
PIGA	Plasma-melting Induction-guiding Gas Atomization (Pulververdüngungsanlage)
R <sub>m</sub>	Zugfestigkeit
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Endoribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute (Umdrehung pro Minute, Drehzahl)
R <sub>p0,2</sub>	Dehngrenze
rRNA	Ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
R <sub>z</sub>	Rauheit
SDS	Sodiumdodecylsulfate
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-Buffered Saline
TLS	TLS Technik GmbH & Co Spezialpulver KG
TMB	Tetramethylbenzidin
Ti-6Al-4V	Titanlegierung
TiO <sub>2</sub>	Titaniumdioxid
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TMP	Substrat Lösung
1 % Al	≤ 45 µm + 1 % Aluminium

## 1 Einleitung

Um die Lebensqualität der Menschen zu verbessern, gewinnen orthopädische Implantate immer mehr an Bedeutung. Im Jahr 2004 bekamen 234.000 Patienten ein künstliches Hüftgelenk, und es wird bis zum Jahre 2030 ein kontinuierlicher Anstieg um 174 % im Bedarf solcher Hüftimplantate erwartet (AAOS 2006a/c) [1]. In dieser Statistik ist nicht die wachsende Zahl von Revisionsoperationen beinhaltet. Der Begriff Revision definiert den Austausch von einem bereits im Körper vorhandenem Implantat. Der Austausch der Implantate erfolgt meistens nicht aufgrund der beschränkten Materialhaltbarkeit. Die heutigen Implantate besitzen eine ausreichende Belastbar- und Benutzbarkeit für die gesamte Lebensdauer des Patienten. Der Grund für eine Revision dafür liegt meist in der nicht dauerhaften Verankerung des Implantats im Knochen. Die Folge ist eine Lockerung des Implantats, die zu Problemen und daraus folgend zu einer Entfernung des Implantats führen [2]. Da die durchschnittliche Lebensdauer eines Implantats im Körper eines Menschen bei 10-15 Jahren liegt, wird ein doppelter Anstieg von Revisionsoperationen bis zum Jahre 2026 erwartet. Revisionsoperationen sind mit vielen Nachteilen verbunden [1]. Im Vergleich zu Erstoperationen sind sie viel schwieriger und aufwendiger. Es entsteht außerdem ein größerer Verlust von Knochensubstanz und sie sind mit höheren Kosten verbunden. Ziel der Forschung ist deshalb die Vermeidung von Revisionen durch die Verwendung von Produkten mit guten Langzeitergebnissen [2].

Bei dem Anforderungsprofil an Implantatwerkstoffe müssen zwei Blickrichtungen berücksichtigt werden: zum einen die mechanischen und zum anderen die biologischen Anforderungen. Der Ideale Implantatwerkstoff wäre ein Material der Knochenähnliche Eigenschaften vorweist. Zudem ist die Oberflächengestaltung wichtig, da dieser Parameter die dauerhafte Verankerung des Implantats maßgeblich beeinflusst [73].

Bei den biochemischen Voraussetzungen ist in erster Linie die Biokompatibilität, sowie die Korrosionsbeständigkeit der Werkstoffe zu berücksichtigen. Da die Implantatoberfläche direkten Kontakt zum lebenden Gewebe hat, muss eine gute Wechselwirkung der Zellen mit dem Implantat und der Umgebung gegeben sein, so dass eine sichere und starke Bindung, d. h. Anwachsen der Knochen an das Implantat gewährleistet ist [70]. Diese sogenannte Osseointegration ist ein wesentlicher Faktor für eine erfolgreiche Implantation. Durch die Integration des Implantats in die Knochenstruktur kann dessen Überlebenszeit im Körper des Patienten erheblich verlängert werden [1].

Implantate, die in den Knochen eingebracht werden, müssen gut mit den Knochenzellen, den Osteoblasten, die für den Knochenaufbau verantwortlich sind, verträglich sein. Somit sind sie ein wichtiger Parameter für die Knochenneubildung wie z. B. beim Knochenwachstum und der Osseointegration von Implantaten [5]. Die Bedeckung der Implantatoberfläche mit Osteoblasten ist entscheidend für die Gewebeantwort an der Oberfläche des Biomaterials [6]. Um eine optimale Bindung des Implantats mit dem umgebenden Knochen zu erreichen, kann beispielsweise die Implantatoberfläche verändert werden. Aus diesem Grund wurde die Wirkung der Oberflächentopographie auf das Gewebe umfangreich *in vitro* und *in vivo* über die

letzten Jahrzehnte getestet. Nach den Aussagen einiger Forscher wird ein Zusammenhang zwischen der Oberflächenrauigkeit und der verbesserten Zelladhäsion und der Proliferation gefunden. Angeblich sollen Osteoblasten Oberflächen mit erhöhter Rauigkeit bevorzugen.

Ziel dieser Diplomarbeit ist, ein Material für die Herstellung permanenter poröser Implantate zu finden, welches im orthopädischen Bereich eingesetzt werden kann. Das Metallpulverspritzgießen ermöglicht es, komplexe Teile kostengünstig in ihrer Endgestalt herzustellen. Durch diesen Herstellungsprozess kann, durch eine Auswahl bestimmter Pulvergrößen, gezielt eine Porosität in das zu produzierende Teil eingebracht werden. Der Vorteil der Porosität besteht darin, dass durch das Einwachsen des Knochens in die porösen Strukturen eine festere Verbindung zwischen Implantat und Knochen geschaffen werden kann. Dies soll zu einer dauerhaften Einbringung des Implantates im Körper führen.

Die Diplomarbeit umfasst die Herstellung der Proben mit der die Analyse der Porengrößenverteilung und der Porosität sowie als Schwerpunkt die biologische Untersuchung. Die intensivere Auseinandersetzung mit der mechanischen Charakterisierung der Proben wird in der Diplomarbeit von Haithem Akaichi behandelt [9].

Die in der Anwendung befindliche Titanlegierung Ti-6Al-4V wurde zur Herstellung poröser Prüfkörper, deren mechanische Eigenschaften näher an denen des Knochens sein sollen, gewählt. Da der optimale Porengrößenbereich für das Einwachsen von Zellen in der Literatur sehr divers diskutiert wird, wurden fünf verschiedene Porositäten biologisch getestet. Bei einer Probe wurden zusätzlich als Platzhalter Aluminiumfäden verwendet. Der Vorteil der Aluminiumfäden besteht darin, dass durch die Diffusion der Fäden im Material größere Poren entstehen können.

Im Biologischen Teil dieser Diplomarbeit wurden die Adhäsion, Proliferation und die Differenzierung der Osteoblasten und der Nabelschnurstammzellen (HUCPV) untersucht. Die Differenzierung der Zellen kann auf verschiedene Weise getestet werden. Analysiert werden soll die Alkalische Phosphatase (ALP) Produktion, das für die Knochenproduktion zuständig ist, sowie das Osteokalzin, das Teil der extrazellulären nicht kollagenen Knochenmatrix ist. Durch eine Parallelfärbung kann weiterhin der Nachweis von Osteopontin bewiesen werden, dass an der Erhaltung der Knochensubstanz beteiligt ist [65]. Durch die RT-PCR sollen zusätzlich zudem die Differenzierungsfaktoren BSP, RANKL, Osteoprotegerin sowie weitere Proteine wie col1 und cbfa1 analysiert werden.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Knochenzellen

In dieser Diplomarbeit wurden Osteoblasten verwendet. Die Differenzierung von Osteoblasten ist meist die wichtigste Stufe, um ein stabiles und dauerhaftes Implantat zu erhalten, da die Matrix produzierenden Osteoblasten direkt an der Knochenbildung beteiligt ist und dadurch für den Aufbau von Knochengewebe zuständig ist. Da der Knochen kein starres, statisches Gebilde ist befindet es sich im ständigen Auf- und Abbau. Das wichtige hierbei ist das es ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Aufbau und Abbau geben muss. Der mechanische Stimulus ist deshalb sehr wichtig. Ist der mechanische Stimulus größer als die Sollspannung, so überwiegt der Aufbau, und ist andererseits der Stimulus niedriger als die Grenzspannung, so überwiegt der Abbau [72]. Als Sollspannung wird die Dehngrenze, innerhalb derer die Knochenmasse zu- und abnimmt nach Pauwels bezeichnet [62]. Beim ständigen Auf- und Abbau des Knochens sind Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten beteiligt. Sie steuern außerdem auch den Calciumstoffwechsel [17]. Die Osteoblasten aktivieren die Mineralisierung (Verkalkung). Die Mineralisierung findet im Osteoid statt, welches das organische Grundgerüst des Knochens ist. Die Aufbaurrate ist je nach der Aktivität und der Anzahl der Osteoblasten abhängig. Die Osteoblasten und die kollagenen Fibrillen werden während der Osteoidbildung eingeschlossen. Die eingeschlossenen Osteoblasten im Osteoid werden als Osteozyten bezeichnet, welches in knöchernen Höhlen eingelagert ist. Für den Knochenabbau sind die Osteoklasten zuständig, die vielkernige Riesenzellen sind [15]. Die Mineralsalze bilden zusammen mit den kollagenen Fibrillen und der glykoproteinhaltingen Grundsubstanz, die von den Osteoblasten abgesondert werden einen Materialverbund, welcher gegen mechanische Beanspruchung beständig ist und damit die Festigkeit des Knochens bewirkt. Dieses hoch organisierte Verbundmaterial (Knochengewebe) besteht aus einer organischen Matrix und einem anorganischen Anteil [15].

Die Gesamtheit aller Makromoleküle im Interzellulärraum ist Bestandteil der extrazelluläre Matrix, die für die Kompressionsfestigkeit und für die Zugfestigkeit zuständig ist. Die organische Matrix ist wiederum für die Zugfestigkeit zuständig. Knochen besteht im Allgemeinen zu zwei Drittel aus einer extrazellulären Matrix und zu einem Drittel aus organischen Substanzen. Die Zusammensetzung der organischen Matrix besteht hauptsächlich aus 90 % Typ1 Kollagen und anorganischer Matrix, die größtenteils aus Hydroxylapatit besteht [63][16].

Typ1 Kollagen wird von Osteoblasten synthetisiert und enthält Fasern mit 300 nm in der Länge und 0,5 nm im Durchmesser. Hydroxylapatit-Kristalle können eine Dicke von 2-5 nm und 20-80 nm Länge erreichen. Zusammen sind diese chemischen Komponenten der Knochenmatrix verantwortlich für die mechanische Beschaffenheit von Knochen (Härte des Knochens). Die restlichen 10 % der organischen bestehen aus verschiedenen Proteinen. Einige der Proteine sind: Knochenspezifische Proteine wie Osteokalzin, Osteonektin und Osteopontin, die zusammen mit der alkalischen Knochenphosphatase zu einer kontrollierten Mineralisierung des Knochens beitragen [16]. Der E-Modul des kortikalen Knochens liegt bei 20 GPa [18].

## 2.2 Stammzellen



Abb. 1: Entwicklung des Menschen [10]

Mesenchymale Stammzellen sind für die Entwicklung und Neubildung von Körperzellen verantwortlich. Sie sind in verschiedenen adulten und embryonalen Geweben des Menschen zu finden. In der Zellkultur haben die adulten Stammzellen ein deutlich geringeres Selbsterneuerungsvermögen und ein eingeschränktes Differenzierungspotenzial als embryonale Stammzellen. Adulte Stammzellen sind unter anderem im Knochenmark, Haut, Gehirn, Leber Nabelschnur und Nabelschnurblut zu finden [64].

Durch 3 Besonderheiten unterscheiden sich Stammzellen von anderen Zellen in unserem Körper:

1. Sie teilen sich über einen längeren Zeitraum, im Vergleich haben andere Zellen nur eine begrenzte Lebensdauer.
2. Sie sind nicht spezialisiert.
3. Durch Teilung können Stammzellen spezialisierte Zellen herstellen.

Sie sind multipotent und können sich unter geeigneten *in vitro*- und *in vivo*- Bedingungen (in der richtigen Umgebung mit den richtigen Nährstoffen versehen) zu verschiedenen mesenchymalen Geweben ausdifferenzieren und zu spezialisierten Zellen werden. Mit bestimmten Wachstumsfaktoren können die Stammzellen zu verschiedenen Zelltypen differenzieren wie z. B. in Hautzellen, Osteoblasten, Chondrocyten, Adipozyten, Myocyten differenzieren, und Knochen-, Knorpel-, Fett-, und Muskelgewebe bilden [11][12][57].

Mesenchymale Stammzellen haben die Eigenschaft, schnell und stabil auf Plastik- oder Glasoberflächen zu adhären, und koloniebildende Fibroblasten zu produzieren [13][14].

## 2.3 Verschiedene Differenzierungsmarker

Das BSP ist ein glykosyliertes, sulfatiertes Phosphoprotein welches 12 % der nicht kollagenen Proteine des Knochens ausmacht. BSP wird durch Osteoblasten zeitgleich mit dem Osteokalzin und der Mineralisation gebildet. Weiterhin sind Osteozyten und Osteoklasten in der Lage BSP zu bilden. BSP ist neben dem Osteokalzin eine Hauptkomponente der nicht kollagenen Proteine des Knochens [8] RANKL (= Osteoprotegerin Ligand oder Osteoklastendifferenzierungsfaktor) spielt eine entscheidende Rolle in der Reifung und Aktivierung von Osteo-

klasten und ist für deren Überleben notwendig. Es wird von Osteoblastenstammzellen gebildet. Eine gesteigerte RANKL Produktion führt lokal zu einer gesteigerten Knochenresorption durch die vermehrte Bildung von Osteoklasten und in weiterer Folge zum Abbau von Knochensubstanz. Damit eine einmal stimulierte Knochenresorption nicht bis zur vollständigen Auflösung des Knochens weiterläuft, existiert ein Gegenspieler nämlich das Osteoprotegerin. Osteoprotegerin dockt an RANKL an und hemmt dadurch die biologische Wirksamkeit. Der RANKL-OPG-Komplex blockiert die RANKL-Aktivität und damit wird die Reifung der Osteoklasten gehemmt [71]. Das Osteopontin ist auch ein wichtiger Differenzierungsmarker, es wird durch die Osteoblasten gebildet und ist ein Protein, das an der Erhaltung der Knochensubstanzen beteiligt ist. Es bildet Hydroxylapatit und stellt die Grundstruktur (Matrix) für Knochen her [7].

## 2.4 Ti-6Al-4V

Es werden hohe Anforderungen an Biwerkstoffe gestellt. Sie müssen Biokompatible, Korrosionsbeständig und eine gute Bioadhäsion aufweisen. Genauso wichtig ist ihre mechanische Eigenschaft wie die Dauerfestigkeit und der Elastizitätsmodul sowie ihre Verfügbarkeit (Angebot und Nachfrage)

Von den metallischen Werkstoffen können nur eine begrenzte Auswahl die Kombinationen dieser Eigenschaften erfüllen. Ti-6Al-4V ist eines der Materialien wird hauptsächlich in der Medizintechnik sowie in der Luft und Raumfahrttechnik eingesetzt [23]. Die hohe Bruchfestigkeit und geringes Gewicht zeichnet das Titan aus. Steinemann hat in seinen Versuchen die Biokompatibilität der Titanlegierung Ti-6Al-4V nachgewiesen und damit die Grundlage für die Verwendung der Titanwerkstoffe in direktem Knochenkontakt gelegt [74][24]. Obwohl Titan ein eher unedleres Metall ist, das zur Freisetzung von Ionen in einer Elektrolytlösung neigt, weist diese Legierung eine hohe Korrosionsfestigkeit auf [23].

Werkstoffkundlich ist jedoch nicht das reine Metall Titan biokompatibel, sondern die sich im Millisekundenbereich bildende natürliche Oxidschicht ( $\text{TiO}_2$ ) an der Oberfläche der Implantate [75][23]. Die Freisetzung von Ionen aus dem Metall stellt eine Grundvoraussetzung für allergische und systemtoxische Reaktionen dar, was jedoch weitgehend durch die Oxidschicht verhindert wird. Nach einer Minute beträgt die Dicke der Oxidschicht bereits 100 Å. Die Osseointegration und die Zellanlagerung auf der Oberfläche wird durch die Oxidschicht beeinflusst [15].

Die in dieser Arbeit verwendete Titanlegierung besteht aus 6 % Aluminium, 4 % Vanadium und 90 % Titan. Das Element Vanadium ist in hohen Dosen für seine zytotoxischen Eigenschaften bekannt und wird daher standardmäßig nur für hochbelastete Implantate verwendet. Metallische Biomaterialien werden oft mit zytotoxischen oder wenig biokompatiblen Elementen legiert, um die mechanischen Eigenschaften des Implantats den Anforderungen unter physiologischen Bedingungen anzupassen. Diese Legierung wird trotz des Vanadiumgehalts als biokompatibel eingestuft, weil der Vanadiumgehalt gering ist und teilweise in fester Lösung in der  $\beta$ -Phase vorliegt [23].

Als schwerstes Leichtmetall liegt die Dichte von Ti-6Al-4V bei  $4,43 \text{ g/cm}^3$ . Vergleicht man die Ausgewogenheit zwischen der Dichte und den mechanischen Eigenschaften des Materials mit der von Aluminium- oder Stahlwerkstoffen, wird der Vorteil der Titanlegierungen für den Einsatzgebiet in der Medizin für Implantate erkannt [23].

- Härte: 300-400 HV
- E-Modul: (20 °C) =  $\sim 115000 \text{ MPa}$
- Bruchdehnung: 14-17 %
- Brucheinschnürung: 35-55 % [25]

Reines Titan und Titanlegierungen zeigen sich nachweislich als hervorragend körperverschlinglich [23].

Werkstoff	Streckgrenze [N/mm <sup>2</sup> ]	Zugfestigkeit [N/mm <sup>2</sup> ]	Bruchdehnung [%]	E-Modul [GPa]
Ti-6Al-4V	800	900	12	110
Rostfreier Stahl	200	650	40	210
Aluminium	20-60	75-110	7	70
Knochen	-	133	0,6	17

[23][53][54][26][27]

Tabelle 1: Streckgrenze, Zugfestigkeit, Bruchdehnung und E-Modul von Implantatwerkstoffen

## 2.5 Poröses Titan als Implantat

Die Aufgabe von medizinischen Implantaten ist, die Körperfunktionen zu unterstützen oder zu ersetzen. Ein Implantat ist ein künstliches Material, das in den Körper eingepflanzt wird. Für verschiedene Implantate gibt es auch vielerlei Varianten von Materialien und Härten die verwendet werden. Bei den Hüft- und Kniegelenken werden die härtesten Materialien verwendet [19]. Aufgrund der auftretenden hohen Zugspannungsbelastungen bestehen die Implantate aus metallischen Werkstoffen, da nur diese Werkstoffe in der Lage sind, die Zugspannungen zu tolerieren. Beim Implantat sind Form, Größe und Steifigkeit ausschlaggebend. Als Steif wird das Implantat angesehen weil sein Elastizitätsmodul etwa zehnmal größer ist als der des Knochens. Titan erfüllt die Bedingungen der optimalen Steifigkeit als Implantat [76]. Das Implantat sollte im optimalen Fall den Knochen ideal nachahmen mit einem E-Modul von etwa 8-28 GPa, je nach Mineralgehalt, Dichte, Feuchtigkeit, Beanspruchungsrichtung und Geschwindigkeit des Knochens. Bezüglich der Elastizität ist Titan noch am besten geeignet mit einem E-Modul von etwa 105-110 GPa. Ziel ist es, dass das Poröse Ti-6Al-4V z. B. im Bereich der Orthopädie eingesetzt werden kann für z. B. Hüftimplantate oder als Füllmaterial für Knochendefekte.

Das Anforderungsprofil z. B. an Hüftprothesen ist sehr hoch gestellt, sie müssen

- korrosionsbeständig
- abriebbeständig
- verträglich (keine Allergien!!!)
- widerstandsfähig gegenüber den Druck- und Biegebelastungen der Körperbewegungen sein.

Diesem Anforderungsprofil werden nur wenige Metalllegierungen wie Ti-6Al-4V gerecht. Es gibt drei verschiedene Prothesentypen, die sich in der Art und Weise der Prothesenverankerung im körpereigenen Knochen unterscheidet. Je nach Erkrankungen und Beschaffenheit des Knochens werden die Hüftendoprothesen in den Knochen zementiert, verklemmt oder geschraubt [22].

Für die porösen Implantate würde die Zementfrei Prothese sich eignen. Die Prothese wird bei der zementfreien Verankerung genau in den Oberschenkel eingepasst oder eingeschraubt. Zwischen beiden Substanzen wird eine enge Verbindung eingegangen, da der umgebende Knochen an die Prothese heran wächst. Der Knochen verwächst umso stärker mit der Prothese, je länger die Prothese im Knochen verbleibt [20].

## 2.6 MIM Verfahren

Das MIM Verfahren (MIM = Metal Injection Molding) umfasst 4 Schritte. Die Teilschritte bestehen aus:

- Feedstock Herstellung
- Spritzgießen des Grünlings
- Entbinderung des Braunteils
- Sintern zum Endprodukt

Der erste Schritt in diesem Prozess ist die Feedstock Herstellung. Der Feedstock selber besteht aus Ti-6Al-4V Pulver und einem Binder. Ti-6Al-4V Pulver alleine hat eine sehr hohe Schmelztemperatur von  $T=1649\text{ °C}(\pm 15\text{ °C})$ . Die verspritzte Masse wird in der Spritzgießmaschine ca. auf  $100\text{ °C}$  erwärmt. Das Pulver kann nicht fließen, deswegen werden Wachse und Kunststoffe als Binderkomponenten benutzt, damit der Feedstock in der Förderschnecke in den Fließeigenschaften dem Kunststoff ähnelt [31]. Eine wichtige Eigenschaft des Binders sollte sein, dass er sich rückstandsfrei wieder entfernen lässt und keinen Einfluss auf die Eigenschaften des Werkstoffes ausübt [34]. Der Binder besteht aus Thermoplasten, Wachsen und/oder Harzen die verschiedene Schmelztemperaturen besitzen. Um den fertigen Feedstock zu erhalten werden beide Komponenten miteinander vermischt.

Über eine Spritzanlage wird der fertige Feedstock in ein Formwerkzeug gepresst, der die Geometrie des zu fertigenden Bauteils bestimmt. Das entstehende Bauteil dieses Vorgangs nennt man Grünteil [31].

Die Entbinderung muss vor dem Sintern möglichst vollständig abgeschlossen sein, da sich beim Sintern geschlossene Poren bilden, wodurch etwaige Binderreste nicht mehr abgebaut werden können. Das Entbinderungsverhalten wird in 2 Stufen realisiert: chemische Entbinderung und thermische Entbinderung. Die Entbinderung ist nötig um einzelne Anteile der Binder, auf unterschiedliche Weise zu entfernen. Mit Hilfe von Lösungsmitteln/-dämpfen wie Wasser, Alkohol, Aceton oder Kohlenwasserstoffe wird bei der chemischen Entbinderung mehr als 60 m. % des gesamten Binderbestandteils aus dem Bauteil entfernt ohne sie zu Zersetzen. Dabei werden die Paraffine durch eine Hexanbehandlung unter Normaldruck in 20 Stunden entfernt. Das ganze verläuft bei Temperaturen oberhalb des Schmelzpunktes des Binders (hier 20-40 °C) [31][37][32]. Nach Ablauf der Entbindung sollte das Bauteil in einem Schutzgas wie Argon getrocknet und bis zur Sinterung gelagert werden [37].

Anschließend erfolgt die Entfernung der langkettigen Polymere Lupolen V und der Stearinsäure in dem Braunling durch die thermische Entbindung. Dazu wird das Bauteil auf 400 °C aufgeheizt, es finden hier bereits die Anfänge des Sinterns statt, die bereits die Pulverteilchen mit einander verbinden. Diese Temperatur wird für eine Stunde gehalten. Durch Nachheizen bei 850 °C wird erreicht, das sich erste Sinterhalse zwischen den Körner ausbilden, wodurch die Formstabilität nach der vollständigen Entbinderung gesichert ist. Diese Prozesse benötigen einen Großteil der gesamten Produktionszeit [32].

Durch das herausgelöste Volumen des Binders ist eine Porosität entstanden. Diese wird im letzten Prozessschritt durch Sintern dicht unterhalb der Schmelztemperatur des Metalls reduziert. Die Verfestigung von kristallinen, körnigen oder pulverigen Stoffen durch das Zusammenwachsen von Partikeln bei Temperaturen dicht unterhalb des Schmelzpunktes  $T_m$  des Materials (üblich ist  $0,8 - 0,9 \cdot T_m$ ) werden als Sintern bezeichnet [31][32]. Vor dem Sintern existiert noch keine metallische Bindung zwischen den einzelnen Partikeln. Die Pulverteilchen liegen in lockerer Packung (Braundichte) vor. Für das Sintern werden die Teile entweder mit einem Restbindergehalt oder bereits angesintert in den Sinterofen gegeben. Während des Sintervorgangs beginnt der Braunling in allen Raumrichtungen gleich zu schrumpfen und erreicht Enddichte und Masse des Bauteils und somit die hohe Festigkeit [31].

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Probenherstellung mittels MIM

Zur Herstellung der Plättchen, die in dieser Diplomarbeit verwendet wurden, werden zunächst Metallpulver und Bindersystem zusammengemischt. Das Metallpulver ist argongasverdüstertes sphärisches Ti-6Al-4V Eli (Extra Low Interstitial Alloys) mit unterschiedlichen Teilchengrößen. ELI werden  $\alpha$ -Legierungen bezeichnet, die bis zu tiefen Temperaturen bei sehr geringen Anteilen interstitiell gelöster Elemente erhalten bleibt [58].

Bei dieser Diplomarbeit wurden die Pulverteilchengrößen  $\leq 45 \mu\text{m}$ ,  $45 - 63 \mu\text{m}$  und  $125 - 180 \mu\text{m}$  verwendet. Die Pulverteilchengröße  $125 \mu\text{m} - 180 \mu\text{m}$  wurde mit dem PIGA-Verfahren im Helmholtz-Zentrum Geesthacht hergestellt, die beiden anderen Pulverteilchengrößen wurden von der Firma TLS Technik GmbH & Co. Spezialpulver KG aus Bitterfeld mit dem EIGA-Verfahren hergestellt [59]. Beim Piga-Verfahren wird das zu verdüsende reaktive Metall induktiv zerschmolzen oder mittels Plasma in einem Wassergekühlten Kupfertiegel [29]. Das EIGA-Verfahren ist eine Kombination der Inertgasverdüstung mit einem keramikfreien Schmelzprozess [28].

#### Feedstock Herstellung

Das Pulver wird zusammen mit dem Binder in einer Glovebox durch einen Schaufelknetter, das aus zwei Schaufeln des Typs Sigma besteht, vermischt. Der Binder beträgt 10 % des Feedstockgewichtes. Er besteht aus den Komponenten Paraffinwachs 1.07157.1000 (10 %), Paraffinwachs 1.07158.1000 (50 %), Stearinsäure 1.00671.9020 (5 %) und Lupolen V 2920K (35 %). Die verwendete Bindermenge müsste jedes Pulverpartikel ausreichend benetzen, aber wiederum sollte die Menge an Binder möglichst gering sein, weil sich das Ausmaß der Schrumpfung bei der Sinterung proportional zum Binderanteil verhält. Die Paraffinwachse bestimmen die Fließeigenschaften der Masse. Die Komponenten Lupolen V gibt dem Feedstock die Formstabilität. Daneben stabilisiert die Stearinsäure die Bindung zwischen den Binderkomponenten und den Metallpartikeln [37]. Die Feedstock Herstellung verläuft so: Beim Vermischen wird zunächst das Pulver auf Vorlauftemperatur erhitzt. Sie beträgt  $100 \text{ }^\circ\text{C} - 105 \text{ }^\circ\text{C}$  und wird über ein Thermoelement direkt in der Knetmasse abgegriffen. Nach einer halben Stunden Temperierung wird die Mischtemperatur erreicht, woraufhin die leicht schmelzenden Binderanteile und schließlich das Polyethylen hinzu gegeben werden. Man erhält nach einer weiteren Knetzeit von einer Stunde einen homogenen Feedstock in dem die einzelnen Metallpulverteilchen benetzt sind, der durch Weiterfahren der Maschine während des Abkühlvorganges granuliert wird.

#### Spritzgießen bis zum Grünling

Die Proben sind mit der Spritzgießmaschine MTT-100KSA hergestellt worden. An diesem Gerät wird nur sehr wenig Feedstock benötigt, um die gewünschten Proben herstellen zu können. Der Feedstock wird in die Spritzmaschine gegeben, wo es bei einer Temperatur zwischen  $110 - 120 \text{ }^\circ\text{C}$  plastifiziert wird und mit einem Druck von ca. 5 bar in einem tempe-

rierten Formwerkzeug eingespritzt wird. Dieser besteht aus einem hochfesten Stahl, es ist in zwei Hälften geteilt und mit zwei Auswerfern versehen. Somit kann die Probe nach dem Erstarren problemlos aus der Form entfernt werden.

Folgende Parameter wurden eingestellt:

- Einspritztemperatur: 110 °C - 120 °C
- Einspritzdruck: 5 bar - 5,7 bar
- Einspritzzeit: 1 s
- Werkzeugtemperatur: 60 °C

### **Entbindung zum Braunteil**

Durch das Formwerkzeug können Plättchen mit einem Durchmesser von ca. 28 mm hergestellt werden. Diese Proben sind auf einem Blech in den Entbinderungsöfen von der Firma LÖMI Typ: LRA-50/EBA-50 platziert worden, wo sie für 20 Stunden unter Hexanbehandlung bei einer Temperatur zwischen 20-40 °C verweilen. Nach der chemischen Entbinderung sind die Proben in Argon über Nacht getrocknet worden.

Der fertige Braunteil, wird durch ein 8 mm Ausstanzwerkzeug in 5 kleine 8 mm Plättchen ausgestanzt, die anschließend gesintert werden und dann für die biologischen Test verwendet werden können.

### **Sintern zum Endprodukt**

Im MIM-labor finden die thermische Entbinderung und das Sintern im kombinierten Entbinderungs-Sinterofen XVAC der Firma Xerion Ofentechnik GmbH statt.

Der Ofenverlauf für die thermische Entbinderung und das Sintern von den Teilen wird so programmiert, dass die Braunlinge zuerst bei 400-500 °C in 4-5 Stunden thermisch entbindert werden wie oben erklärt und anschließend bei 1350 °C in 2 Stunden einer passenden Atmosphäre gesintert werden.

## **3.2 Metallographische Probenpräparation**

Die Ti-6Al-4V Proben wurden eingebettet, damit sie die Stabilität zum Schleifen und Polieren erhalten. Bei der Einbettung muss die Härte des Einbettmittels mit der Härte der Probe abgestimmt werden. Für die Ti-6Al-4V Proben wurden die Kalteinbettmethode mit dem Einbettmittel Demotec 30 benutzt. Die Proben werden in Gießformen fixiert. Das Einbettmittel wurde gemixt und schnell in die Formen gegossen. Die Blöcke härten sich innerhalb einer halben Stunde aus.

Die Schleifarbeit erfolgt an einer Schleifmaschine Tegrapol-35, Struers. Zum Erlangen der glatten Schliifoberfläche werden die Siliziumkarbid- Nassschleifpapier mit verschiedenen

Körnungen wie 320, 500, 800, 1000, 1200 und 2400 benutzt. Die Schleifarbeit erfolgt unter einer Andruckkraft von 60 N für je 1 min bei 300 Umdrehungen pro Minute.

Die Polierarbeit erfolgte mit derselben Maschine wie beim Schleifen, aber mit niedriger Andruckkraft 30 N und mit einer Drehung der Schleifscheibe von 150 Umdrehungen pro Minute. Für den Vorgang wurden ein besonderes Poliertuch und eine Poliersuspension aus 250 mL OPS, 40 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 mL HNO<sub>3</sub>, 0,5 mL HF verwendet. Das Polieren dauert 5 Minuten. Zum Abschluss wurde die Probe mit Wasser und Pril gereinigt und mit Warmluft getrocknet.

### 3.3 Mikroskopie

#### Lichtmikroskopische Untersuchung

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen aller Proben wurden bei 50 - fach Vergrößerung, an einem Leica MZ 95 mit polarisiertem Licht erstellt. Die Analyse erfolgte mit dem Adobe-Photoshop-Programm. Aus einem schwarz / weiß Abgleich, wobei die schwarze Fläche die Poren und die weißen Flächen das Material darstellen, wird die Porosität berechnet.

Bei der Bestimmung der Porengrößenverteilung wurde ein lichtmikroskopisches Bild mit dem AnalySIS-Programm auf schwarz / weiß Abgleich eingestellt. Bei der Bildverarbeitung werden die Porengrößen je nach Größe farbig dargestellt. Poren gleicher Größe wurden mit einer Farbe gekennzeichnet. Verbundene Poren werden als einzelne Pore betrachtet. Das Programm misst den mittleren Durchschnitt einer Pore und stellt die Werte in einer Excel-Tabelle aus.

#### Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Die REM- Bilder in dieser Diplomarbeit wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop von der Firma Zeiss, DSM962 hergestellt. Die REM- Aufnahmen sind bei 20kV Beschleunigungsspannung und 25mm Arbeitsabstand im SE-Modus direkt von der Oberfläche der zu untersuchenden Ti-6Al-4V-Proben aufgenommen worden.

### 3.4 Geometrische Dichtebestimmung

Diese Methode kann für Körper, die eine einfache Geometrie besitzen angewendet werden. Zunächst werden die Proben nach dem Sintern gewogen und ihre Abmessungen bestimmt. Daraus wird das Volumen

$$V = \pi * d^2 / 4 * H$$

und nach der Formel

$$\rho = m / V$$

die Dichte der Proben berechnet.

Die relative Dichte wurde nach der Formel

$$D = \rho / \rho_{\text{theoretisch}}$$

ermittelt.

Abschließend wird die Restporosität der Proben mittels dieser Formel berechnet:

$$P (\%) = (1 - D) * 100 \%$$

### **Isolierung von Zellmaterial aus Hüftknochen**

Die Knochenzellen (Osteoblasten) wurden aus der Epiphyse des menschlichen Oberschenkelknochens gewonnen. Die Epiphyse stellte das Schön Klinikum Eilbek in Hamburg zur Verfügung. Bevor die Epiphyse präpariert wurde, wurde sie in sterilem 1x PBS-Puffer (pH 7,4) gelagert. Mit sterilem Besteck wurden die Gewebestückchen aus der Spongiosa der Epiphyse heraus geschabt und in ein steriles Falconröhrchen überführt. Die Gewebestückchen wurden so oft mit PBS gewaschen, bis das PBS eine klare Farbe zeigte. Anschließend wurden die Stückchen in eine sterile Kulturflasche überführt und mit Medium versorgt (DMEM +10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S)). Die Zellen wurden mehrere Wochen ohne die Gewebestücke zu bewegen inkubiert, um sie aus dem Zellverband wachsen zu lassen. Alle 2 - 3 Tage fand ein Mediumwechsel statt. Nach 4 - 8 Wochen konnten die Zellen, die auf dem Boden der Kulturflasche adhäriert sind, mit einem Zellschaber gelöst werden. Das Medium mit den gelösten Zellen wurde in ein steriles Falconröhrchen überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und durch erneute Mediumzugabe, konnte die gewünschte Zellzahl/mL eingestellt werden. Nach Bedarf wurden sie entweder weiterkultiviert oder eingefroren.

### **Isolierung von Stammzellen**

Die HUCPV-Zellen, die in dieser Diplomarbeit verwendet wurden, wurden schon vorher isoliert und für die Verwendung für die Testung bereitgestellt. Die Mesenchymalen Stammzellen wurden von einer Nabelschnur isoliert. Sie wurde in 5 cm Stücke zerschnitten. Die Gefäße von der Nabelschnur wurden isoliert und am Endstück zu einer Schleife zusammen gebunden und zugenäht. Diese wurden in einer T175 Zellkulturflasche platziert und für 10 Tage in  $\alpha$ -MEM + 10 % FKS ohne Mediumwechsel inkubiert. Nachdem der erste Auswuchs der Zellen aus der Schleife sichtbar wurde, wurde das Medium alle 2-3 Tage gewechselt. Nach dem eine Konfluenz von ca. 60 % erreicht wurde, wurden die Zellen mit einem Zellschaber geerntet und in einer Dichte von 1000 Zellen/cm<sup>2</sup> kultiviert. Nähere Informationen können aus dem Protokoll von Herrn Feyerabend entnommen werden [60].

## **3.5 Vorbereiten der Zellen**

In den meisten Fällen wurde mit eingefrorenen Zellen gearbeitet. Sie wurden zügig in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Nach dem Auftauen werden die Zellen in einem Falcon überführt. Diese werden dann für 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Zum Pellet wird frisches Medium aus der Vorratsflasche gegeben und vorsichtig

durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Danach wird es in eine Zellkulturflasche überführt. Es wird das entsprechende Nährmedium für Osteoblasten (DMEM + Glutamax mit einem Zusatz von 10%igem Fetalem Kälber Serum (FKS)) oder Stammzellen (MEM-Alpha mit einem Zusatz von 15%igem humanem FKS) hinzu gegeben und 1 % Penicillin/Streptomycin, um bakterielle Kontamination zu vermeiden. Anschließend wird dann die Zellsuspension bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen werden alle zwei bis drei Tage mit frischem Medium versorgt.

### **Trypsinieren**

Es wird trypsinisiert, um die Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche zu lösen. Dazu wird 0,05 % Trypsin- EDTA (Ethylendiamintetraacetat) verwendet, das ein Komplexbildner für zweifach geladene Metallionen ist. Trypsin EDTA dient dem Verdau von Zelladhäsionsproteinen am Boden der Zellkulturflasche. Durch Entzug von  $\text{Ca}^{2+}$ , das eine tragende Rolle bei Zell-Zell-Verbindungen spielt, kommt es zu einer Auflösung der Zellverbände.

Aus einer mit Zellen bewachsenen Zellkulturflasche wird das verbrauchte Medium mit einer sterilen Pasteurpipette, die über einen Schlauch an einer Vakuumpumpe angeschlossen ist, abgesaugt. Je nach Größe der Flasche wird entsprechend viel PBS gegeben. Für große Flaschen (T 175) wird 10 mL PBS; für mittlere Flaschen (T 75) 5 mL PBS zur Flasche gegeben, um die Zellen mit PBS zu waschen. Das PBS wird ebenfalls abgesaugt. Mit einer Einwegpipette je nach Größe der Flasche (große Flasche 6 mL 0,05 % Trypsin-EDTA; mittlere Flasche 4 mL 0,05 % Trypsin-EDTA) wird Trypsin-EDTA hinzugegeben. Anschließend wird die Flasche für drei Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation werden alle Zellen durch leichtes Schlagen gegen den Boden abgelöst und vereinzelt. Um den Enzymverdau zu stoppen, wird bei großen Flaschen 10 mL und bei mittleren Flasche 6 mL frisches Medium aus einer Vorratsflasche hinzu gegeben.

### **Einfrieren**

Zellen, die nicht gebraucht werden, werden eingefroren.

Idealerweise sollten mindestens  $1 \times 10^6$  (pro 1 mL) Zellen eingefroren werden.

Die Zellen die eingefriert werden sollen werden zunächst einmal trypsinisiert und in ein Falcon überführt, wo die Suspension dann für 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert wird. Vorher wird 50  $\mu\text{L}$  von der Suspension zur Zellzahlbestimmung entnommen. Nach der Zentrifugation wird der Überstand abgesaugt und das entstandene Pellet mit 1 mL DMSO (Dimethylsulfoxid) resuspendiert und in ein Cryotube überführt. DMSO dringt leicht durch Zellmembranen und verhindert Eiskristallbildung beim Einfrieren. Das Cryotube wird in einer Isopropanolbox in einer Kühltruhe zunächst auf -80 °C heruntergekühlt ( $\Delta v = 1^\circ \text{C}/\text{min}$ ). Nach 24 h kann das Cryotube in einem Flüssigstickstofftank bei -196 °C gelagert werden.

### Vorbereitung der Titanproben für die Zellkulturversuche

Die Ti-6Al-4V-Proben sind für die Versuche mehrmals verwendet worden. Nach jedem Versuch mussten die Proben sorgfältig gereinigt werden, um sie für den nächsten Versuch frei von Zellresten zu bekommen. Die Reinigung besteht aus mehreren Waschschrritten. Zunächst werden alle Proben einer Porengröße in ein Glasgefäß sortiert. Bei jedem Waschschrritt werden die Proben für 20 min. im Ultraschallbad gereinigt. Die generelle Reinigung findet in einer 2%igen Hellmanex Lösung statt (die in destilliertem Wasser verdünnt ist). Nach der Reinigung im Ultraschallbad wird die Lösung dekantiert und die Proben mit destilliertem Wasser gespült. Um die Proben von Fetten und Lipiden zu lösen, verwendet man Chloroform. Nach 20 Minuten Ultraschallbad werden auch hier die Proben mit destilliertem Wasser gespült. Die Entfernung von Proteinen bzw. Zellbestandteilen wird durch 100 % Ethanol erreicht. Nach dem Ultraschallbad und dem Spülen mit destilliertem Wasser werden die Proben abschließend zweimal für je 20 Minuten im Ultraschallbad in destilliertem Wasser gereinigt, um die restlichen Lösungsmitteln auf den Proben zu entfernen. Bevor aber die Proben für die Versuche benutzt werden konnten, wurden die gereinigten Proben in Sterilisiertütchen, je 5 Proben in Reihen platziert, laminiert und anschließend im Autoklaven für 20 min bei 2 bar und 121 °C sterilisiert. Anschließend wurden die Proben in den Sterilisiertüten im Trockenschrank getrocknet.

## 3.6 Adhäsion und Proliferation

### MTT-Test

Der MTT-Test ist eine Zellviabilitätsmessung. Bei hoher Zellaktivität wird der gelbe Farbstoff Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu blauvioletter Formazan reduziert. Diese kann dann mit geeigneten Substanzen aus den Zellen herausgelöst und photometrisch ermittelt werden [61]. Die Farbreaktion von dem schwach gelben MTT zu den dunkelblauen Formazan Kristall kommt durch die Aufspaltung des Tetrazoliumringes zustande, wobei zu sehen ist, dass die Reduktion zu Formazan enzymabhängig und hauptsächlich auf mitochondriale Dehydrogenase zurückzuführen ist [38]. Die Zugabe des Solubilisierungslösung (10 % SDS in 0,01 M HCl) führt zur Lyse der Zellmembran. Die Konzentration des katalytischen Produktes Formazan ist direkt proportional zur metabolischen Aktivität lebender Zellen.

Der MTT-Test wurde für die Untersuchung der Zelladhäsion und der Proliferation angewendet. Bei der Bestimmung der Adhäsion wurde nach 1 h, 2 h und 4 h Inkubation MTT zu dem Überstand der zu testenden Proben hinzugegeben und bei der Proliferation nach 5, 10 und 15 Tagen. Es wurde zunächst aus jedem Well 1,5 mL Medium abgenommen (Ausfüllvolumen der Wells ca. 3 mL Flüssigkeit). Es wird in jedem Well 1:10 MTT (= 150 µL) pipettiert und anschließend für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wird 1:1 Solubilisierungslösung (1,5 mL) in jedes Well hinzu gegeben. Die Platte wird über Nacht im Brutschrank aufbewahrt. Die Messung der Zellviabilität erfolgt am nächsten Tag am Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge < 655 nm.

### **Zelladhäsion auf porösen Titanmaterialien**

Untersucht wurde die Adhäsion von Osteoblasten und Stammzellen auf 5 verschiedenen porösen Ti-6Al-4V-Oberflächen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten: nach 1 h, 2 h und 4 h Inkubation. Für diesen Versuch wurden 12 Multiwellkulturplatten verwendet. Damit die Zellen nicht am Boden der Platten adhären, wurde der Boden mit 1%igem Agarosegel beschichtet. Damit soll erreicht werden, dass nur die Zellen erfasst werden, die direkt auf den Probekörpern adhären. Die sterilen Titanproben werden in je ein Well überführt. Es werden für jede Porosität 4 Ansätze gemacht. Die zu testenden Zellen werden zu 75000 Zellen in 50 µL Medium pro Träger ausgesät und für 30 min darauf zum Adhären inkubiert. Nach den 30 min werden die Proben mit 3 mL Medium überschichtet, um die nicht-adhären zu entfernen. Anschließend werden die Plättchen in neue 12 Well Platten überführt. Um weitere Adhäsionszeiten zu testen wurden die Zellen für weitere 30 Minuten (Gesamtadhäsionszeit 1 h Inkubation), 90 Minuten (Gesamtadhäsionszeit 2 h Inkubation) und 210 Minuten (Gesamtadhäsionszeit 4 h Inkubation) inkubiert. Anschließend wurde der gewünschte Versuch durchgeführt.

### **Zellproliferation auf porösen Titanmaterialien**

Die Vorbereitung für die Proliferation ist ähnlich wie die der Zelladhäsion. Die sterilisierten Proben werden in die Agarose beschichteten 12 Well Platten überführt. Es wird für diesen Test das Proliferationsverhalten von Osteoblasten und Stammzellen auf den 5 verschiedenen porösen Ti-6Al-4V-Oberflächen getestet. Es wurden 50000 Zellen in 50 µL Medium auf die Träger für 30-45 Minuten adhären. Es werden auch hier jeweils 4 Ansätze pro Porosität gemacht. 3 mL Medium wird hinzu gegeben und die Platten werden für 5, 10 oder 15 Tage im Brutschrank inkubiert. Alle 2-3 Tage wird das Medium gewechselt. Am Ende der Proliferationszeit wird mittels MTT die Viabilität der Zellen gemessen. Dies ist indirekt auch ein Maß für die Zellzahl.

### **DAPI Färbung der Zellkerne**

Um genaueres über die Verteilung der Zellen auf den Proben zu erfahren, wurde die DAPI Färbung angewendet. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI bindet selektiv an DNA und bildet stark fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe (Zellkernfärbung) mit hoher Spezifität [39].

Dazu wurde den zunächst das Medium entnommen und anschließend mit PBS gewaschen. Die Dapi-Stammlösung wurde in destilliertem Wasser 1:50 verdünnt (1 µg/µL). Die verdünnte Lösung wurde anschließend noch mal 1:1000 in Methanol (1µg/mL) verdünnt. Von dieser DAPI-Lösung wurden 3 mL in jedes Well gegeben. Anschließend werden die Proben für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Wells werden mit Abdeckfolie beklebt, dass verhindert das verflüchtigen des Methanols. Anschließend werden die Proben über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, dadurch wird die Fluoreszenz etwas stabilisiert. Danach kann mit dem Mikroskopieren begonnen werden.

### 3.7 Differenzierung der Zellen

Die osteogene Differenzierung wurde für Osteoblasten und Stammzellen durchgeführt. Die porösen sterilen Ti-6Al-4V-Proben werden in die mit Agarose beschichteten 12 Well-Platten überführt. Es werden auch hier 4 Ansätze von den verschiedenen Porositäten gemacht. Es werden von beiden Zellsorten jeweils 50000 Zellen in 50  $\mu$ L Medium auf die Ti-6Al-4V-Träger ausgesät und können für 30 - 45 Minuten darauf adhären. Dann werden noch einmal 3 mL zellspezifisches Nährmedium hinzu gegeben und für 10 Tage inkubiert, damit die Zellen auf den Proben wachsen können. Alle 2-3 Tage wird das Medium gewechselt. Ab dem 11. Tag wird mit der Differenzierung im Differenzierungsmedium begonnen. Das Kultivierungsmedium wurde mit osteogenetischen Zusätzen wie Dexamethason, L- Ascorbinsäure 2-Phosphat und  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin  $D_3$  für die Züchtung von Knochenzellen versetzt [47]. Die Differenzierung erfolgt in 2 Schritten. Zunächst wird zwischen Tag 11-17 das Nährmedium gegen das Differenzierungsmedium getauscht. Zwischen Tag 18 und Tag 38 wird zusätzlich  $\beta$ -Glycerolphosphat hinzugegeben. Alle 2-3 Tage findet ein Mediumwechsel statt. Der Versuch wird nach 2, 3 oder 4 Wochen beendet. Danach können die Zellen auf ihren Differenzierungsgrad untersucht werden.

#### ALP Bestimmung

Die Osteoblasten produzieren 100 fach mehr ALP als andere Zellen in anderen Geweben deshalb ist ALP der am häufigsten verwendete Nachweis für ausdifferenzierten Osteoblasten. Während der Knochenbildung erzeugen die Osteoblasten große Mengen ALP, was ein zellmembrangebundenes Glykoproteinenzym ist. Die Quantifizierung des ALP's ermöglicht in-vitro eine genauere Bestimmung des Differenzierungsprozesses [68]. Mit dem Alkalische Phosphatase-Test können Osteoblasten und die HUCPV-Zellen durch eine hohe Aktivität von ALP nachgewiesen werden. Der Test sagt aus, ob gewisse Differenzierungsstadien der Osteoblastenentwicklung vorhanden sind. Das Testprinzip basiert auf die Messung des Enzyms. Dabei wird p-Nitrophenylphosphat das als lösliches Substrat verwendet wird, von der in der Probe enthaltene Menge an ALP umgesetzt. Dabei wird die Phosphatgruppe vom Substrat abgespalten und es entsteht ein unlöslicher Farbkomplex (gelbe p-Nitrophenol). Bei einer Wellenlänge von 405 nm am Photometer kann aus der zeitlichen Zunahme der Extinktion die enzymatischen Produktion von p-Nitrophenol direkt bestimmt werden [40]. Für diesen Test wurde der Überstand der Differenzierungswochen 2,3 und 4 verwendet.

Für diesen Test wird eine 96-Well Platte verwendet. In den einigen Wells (siehe Zeichnung) werden jeweils 200  $\mu$ L destilliertes Wasser gegeben. Zum Vergleich werden je 200  $\mu$ L Kalibrierlösung (Tartrazin) in 3 Wells übertragen, um kontrollieren zu können, ob die Messungen erfolgreich verlaufen sind. In den übrigen Wells werden 150  $\mu$ L ALP-Stocklösung übertragen, um anschließend auf diese Wells 50  $\mu$ L von dem Überstand der Probe hinzuzugeben. In jedem Well ist jetzt ein Gesamtvolumen von 200  $\mu$ L vorhanden. Von jeder Probe werden 3 Wiederholungen gemacht. Anschließend wird die Optische Dichte (OP) der Proben sofort im Tecan Sunrise Photometer bei 405 nm zu der Zeit  $t = 0$  und wieder 4 Minuten später zu der Zeit  $t = 4$  gemessen.

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$(I * (U/L) = \mu\text{mol}/(L * \text{min}))$$

$$= ((\text{OD}_{\text{PROBE } t4} - \text{OD}_{\text{PROBE } t0}) * (\text{Reaktions Volumen})) / ((\text{OD}_{\text{KALIBRATOR}} - \text{OD}_{\text{H2O}}) * \text{Proben Volumen} * t) * 35.3$$

- Reaktionsvolumen = 200  $\mu\text{L}$
- Probenvolumen = 50  $\mu\text{L}$
- $t = 4$

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	W	W	W	K	K	K	P <sub>1</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>2</sub>
B	W	W	W				P <sub>3</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>4</sub>
C	W	W	W				P <sub>5</sub>	P <sub>5</sub>	P <sub>5</sub>	P <sub>6</sub>	P <sub>6</sub>	P <sub>6</sub>
D	W	W	W				P <sub>7</sub>	P <sub>7</sub>	P <sub>7</sub>	P <sub>8</sub>	P <sub>8</sub>	P <sub>8</sub>
E	W	W	W	P <sub>17</sub>	P <sub>17</sub>	P <sub>17</sub>	P <sub>9</sub>	P <sub>9</sub>	P <sub>9</sub>	P <sub>10</sub>	P <sub>10</sub>	P <sub>10</sub>
F	W	W	W	P <sub>18</sub>	P <sub>18</sub>	P <sub>18</sub>	P <sub>11</sub>	P <sub>11</sub>	P <sub>11</sub>	P <sub>12</sub>	P <sub>12</sub>	P <sub>12</sub>
G	W	W	W	P <sub>19</sub>	P <sub>19</sub>	P <sub>19</sub>	P <sub>13</sub>	P <sub>13</sub>	P <sub>13</sub>	P <sub>14</sub>	P <sub>14</sub>	P <sub>14</sub>
H	W	W	W	P <sub>20</sub>	P <sub>20</sub>	P <sub>20</sub>	P <sub>15</sub>	P <sub>15</sub>	P <sub>15</sub>	P <sub>16</sub>	P <sub>16</sub>	P <sub>16</sub>

Tabelle 2: 96 Well Platte mit den Proben für den Versuch

P<sub>i</sub> = Probe

W = Wasser

K = Kalibrierlösung

### Osteokalzinbestimmung

Ein weiterer Differenzierungstest ist der Nachweis von Osteokalzin durch einen Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Elisa). Osteokalzin ist ein knochenspezifisches Markerenzym, das hauptsächlich nicht kollagene Protein der Knochenmatrix und wird in den Knochen von Osteoblasten synthetisiert. Nach der Bildung wird es teilweise in die Knochenmatrix eingebaut und teilweise in die Blutbahn freigesetzt. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass die zirkulierende Menge von Osteokalzin die Rate der Knochenbildung wieder spiegelt.

Mittels des ELISA erfolgt die quantitative Bestimmung des von den Zellen synthetisierten, intakten Osteokalzins. Der Test wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Vorbereitend für den Osteokalzin Test wurde der Überstand in der Differenzierungswoche 2., 3. und der 4. Woche abpipettiert, in markierte Eppendorf Tubes gegeben und eingefroren.

Der Osteokalzin ELISA basiert auf der Verwendung eines monoklonalen HPR-konjugierten Antikörpers der von Mäusen gewonnen wurde gegen humanes Osteokalzin. Es wurden 25  $\mu\text{L}$  Überstand von jeder Probe eingesetzt.

Bei diesem Test wird eine Doppelbestimmung gemacht. Es werden zunächst in den Probenwells, dann in die Standardwells 100  $\mu\text{L}$  destilliertes Wasser gegeben. Man entnimmt 25  $\mu\text{L}$  von dem Überstand der zu testenden differenzierten Zellen und pipettiert es in die Probenwells. Die Wells werden mit einer Abdeckplatte abgedeckt und bei Raumtemperatur auf

einem Mikrolattenschüttelgerät bei 100 rpm für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wird die Abdeckplatte entfernt, die Wells werden 3mal mit ca. 400 µL Waschpuffer (Phosphatgepufferte Salzlösung) gewaschen. Nach jedem Waschschrift muss der Puffer vollständig entfernt werden, dies wird erreicht indem man die Wells gegen ein Tuch klopft. Die Wells dürfen nicht trocknen, deshalb muss auch danach sofort in jedem Well 100 µL TMB Substrat (Tetramethylbenzidin) Lösung hinzu gegeben werden. Die Wells werden für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Enzymreaktion wird gestoppt durch sofortige Zugabe von 100 µL Stop- Lösung (1 M Phosphorsäure) was in jedes Well gegeben wird. Die Messung erfolgt bei einer Wellenlänge von 450 nm in dem Spektrophotometer.

### **Osteokalzin/Osteopontin/Dapi Parallelfärbung**

Ein weiterer Differenzierungstest, der jedoch an Zellen durchgeführt wird, ist die Parallelfärbung. Es wurde der Differenzierungsgrad von Osteoblasten und Stammzellen nach 2, 3 und 4 Wochen getestet.

Die Osteokalzinfärbung ist wie oben beschrieben, ein immunhystochemischer Nachweis osteotypischen Osteokalzins. Der Primärantikörper bindet spezifisch an humanes Osteokalzin in der Matrix und wird in einem zweiten Schritt mit Hilfe eines Zweitantikörpers und folgender Farbreaktion sichtbar gemacht. Auch Osteopontin kann so nachgewiesen werden [41]. Hierzu wird die Zellsuspension mit einem monoklonalen Antikörper und einem Fluoreszenzfarbstoff markiert.

Um eine Parallelfärbung vornehmen zu können, wurden unterschiedlich markierte Antikörper ausgewählt: für das Osteokalzin wurde das Fluoreszenzfarbstoff FITC und für Osteopontin das Fluoreszenzfarbstoff Texasred gewählt.

In den Wells mit den differenzierten Zellen wird zunächst das Medium entnommen und mit PBS gewaschen. Danach werden die Proben in eine 24-Well Platte überführt und die Zellen werden mit 3,7%igem Formaldehyd fixiert. Es reichen ca. 700 µL um die Proben zu bedecken. Die Platte wird für 10 Minuten bei Raumtemperatur unter dem Abzug stehen gelassen. Anschließend wird das Formaldehyd entfernt und 700 µL Extraktionslösung zu den Proben hinzugegeben, dadurch erreicht man die Permeabilisierung der Zellen. Die Platte wird wieder für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Extraktionslösung wird entfernt und 700 µL Blockierungslösung zu den Proben hinzugegeben. Die Blockierungslösung verhindert unspezifische und unerwünschte Bindungen an der Oberfläche der Proben. Anschließend wird die Platte dann für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert.

In diesem Versuch wurden für die primären Antikörper monoklonaler anti-osteokalzin clone OC1, der von Mäusen gewonnen wurde und spezifische Epitope Osteopontin, der von Kaninchen gewonnen wurde, verwendet. Diese wurden in 1:200 in TBS + 3 % BSA verdünnt.

Die Zellen werden nun mit beiden primären Antikörpern gleichzeitig 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach werden die Zellen zweimal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wird der zweite Antikörper dazu gegeben und für 1 Stunde bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Die

sekundären Antikörper sind 1. Goat anti-mouse IgG FITC und das 2. Antikörper ist Goat anti rabbit IgG Texas Red. Diese Antikörper werden 1:100 in TBS + 3 % BSA verdünnt.

Anschließend wird 2 x für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Im letzten Schritt wird die DAPI-Färbung durchgeführt (siehe DAPI- Färbung). Anschließend lässt man die Platte über Nacht bei 4 °C im Dunkeln stehen, damit die Fluoreszenz etwas stabilisiert wird. Am nächsten Tag kann mikroskopiert werden.

### **RNA-Gewinnung**

Es sind bei diesem Versuch unterschiedliche knochenspezifische Marker untersucht worden wie ALP, OC, OPN und BSP, die Matrixbildenden Proteine Kollagen1 und cbfa1 und die Osteoklastendifferenzierungsfaktor RANKL und OPG. GAPDH ist ein Housekeeping Gen und wird hier als Referenz verwendet weil die Expression in den verschiedenen Entwicklungsstufen der Knochenzellen immer gleich stark ist.

### **RNA-Isolation**

Für die RNA-Analyse wurden nur die Osteoblasten getestet. Bei der RNA Extraktion wurde die RNA aus den Differenzierungswochen 2, 3 und 4 von den Osteoblasten untersucht. Um den Versuch mit den Zellen, die nach den drei Differenzierungszeiträumen gewonnen wurden, gleichzeitig durchführen zu können, wurde das Medium in dem sich die Zellen auf den Proben befinden durch waschen mit 1x PBS entfernt, und die Proben mit den Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die RNA wurde aus den gewonnenen Zellproben der verschiedenen Differenzierungswochen isoliert. Dazu wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Die aufgetauten Proben wurden mit 600 µL RLT-Puffer lysiert und zur Homogenisierung in QIAshredder Spin -Säulen für 2 Minuten bei 15,000 g zentrifugiert. Anschließend wurde zu dem Lysat 600 µL 70%iges Ethanol zugegeben und durch auf und abpipettieren homogenisiert. Nachfolgend wurden 700 µL von dem Lysat in eine RNeasy Spin Säule überführt und 15 Sekunden bei  $\geq 8,000$  g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um die Säule von Kontaminationen zu befreien, wurde mit RW1-Puffer gewaschen. Hierzu wurden zu der RNeasy Säule 700µL RW1-Puffer hinzugegeben und anschließend für 15 Sekunden bei  $\geq 8000$  g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Hierauf folgten zwei weitere Waschschrte mit 500 µL RPE nach demselben Schema nur das beim zweiten Mal waschen nicht nur 15 Sekunden bei  $\geq 8,000$  g zentrifugiert wurde sondern 2 Minuten. Um die RNA aus der Membran zu eluieren, wurde auf die Membran 50 µL RNase-freies Wasser gegeben und für 1 Minute bei  $\geq 8,000$  g zentrifugiert. Die RNA wurde in einem frischen DNase und RNase freiem 1,5 mL Reaktionsgefäß aufgefangen und während der nachfolgenden Analyse auf Eis gelagert. Längerfristige Aufbewahrung erfolgte bei -80 °C.

### **RNA Integrität und Konzentration**

Bei dem Verfahren erhält man die Information über die Qualität der RNA. Bei diesem Agarose Gel muss nur die 28S und 18S rRNA betrachtet werden. Diese 2 RNA Typen sind am häufigsten in der Zelle vorhanden, bei intakter RNA stellen sich diese RNA- Fraktionen als

scharfe Banden im Gel dar. Die Qualitätsbeurteilung der Gesamtmenge der gewonnen RNA durch die Betrachtung der 28S und 18S rRNA Banden ist dadurch möglich.

Für die Herstellung des RNA Agarose Gels wird 0.7 g Agarose in 70 mL 1x TAE (1 % Agarose Gel) gegeben und in der Mikrowelle für 1 Minute erwärmt, um die Agarose aufzulösen. 5  $\mu\text{L}$  GelRed wird in die Lösung gemischt und für 5 Minuten auf ca. 60° gekühlt. Das Gel wurde blasenfrei auf einen Gelträger gegossen und ein Kamm in das Gel hinein gesteckt. Nach der Polymerisation des Agarose Gels, wurde der Kamm entfernt, und der Gelträger in die Elektrophoresekammer überführt. Es wurde 1x TAE Puffer in die Kammer gegeben, bis das Gel darin eingetaucht war. 2  $\mu\text{L}$  von jeder RNA-Probe wurden mit 2  $\mu\text{L}$  Loading Puffers (Beladungspuffer) (1X) gemischt und in jeweils eine der Geltaschen, die durch den Kamm entstanden waren pipettiert. Das Gel wurde 45 min bei 120 Volt laufen gelassen, um eine optimale Auftrennung der RNA Fragmente zu gewährleisten. Nachfolgend wurde das Gel auf einem UV Transilluminator platziert, dokumentiert und analysiert. Qualitativ sehr gute RNA wurde für die nachfolgenden Analysen verwendet. Die Konzentration der RNA wurde auf einem Spektrophotometer mit einer Absorptionswellenlänge von 260 nm bestimmt. Das Verhältnis der Messungen von 260 nm und 280 nm Wellenlänge ( $A_{260}/A_{280}$ ) gibt Aufschluss über die Reinheit der RNA (Kontamination mit Proteinen). Konzentrationen wurden nach dem Beer's Gesetz berechnet, basierend auf eine RNA Extinktions-Koeffizienten von 25  $\mu\text{L}/\mu\text{g}/\text{cm}$ . Die Proben wurden bei -20 °C oder -80 °C gelagert oder für anschließende Versuche weiter verwendet.

### **Reverse Transkription**

Bei der RT-PCR (Reverse Transkriptasen - Polymerasen Kettenreaktion) besteht die Methode darin die mRNA mit Hilfe einer Reverse Transkriptase in cDNA umzuschreiben. Hierfür werden Oligo- dT-Primer verwendet die komplementär zu dem Poly-A Schwanz der mRNA sind. Durch das Enzym Reverse Transkriptase wird dann ausgehend von dem Primer ein antisense Strang DNA synthetisiert. Es entsteht ein doppelsträngiges RNA-DNA Hybridmolekül, sogenannte cDNA, die als Ausgangsmaterial für die quantitative Real-time PCR dient.

Für die Reverse Transkription wurde der Omniskript Reverse Transkriptase von Qiagen verwendet. Es wurden von den einzelnen Proben 2  $\mu\text{g}$  RNA entnommen, bis 10  $\mu\text{L}$  mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und mit dem Mastermix (2  $\mu\text{L}$  10x RT Puffer, 2  $\mu\text{L}$  dNTP mix (0.5 mM jeweils dNTP), 2  $\mu\text{L}$  Oligo-dT primer (1  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{L}$  RNase Hemmer (10 Einheiten) und 1  $\mu\text{L}$  Omniskript Reverse Transkriptase) versetzt. Die Reverse Transkription Reaktion wird durchgeführt 60 min bei 37 °C. Es wird entweder bei -20 °C gelagert oder für weitere Versuche untersucht.

### **Real-time PCR (qPCR)**

Eine Methode für die Vervielfältigung von Nukleinsäuren ist die quantitative Real-Time oder quantitative Echtzeit-PCR. Sie basiert auf die normale Polymerase-Kettenreaktion nur das zusätzlich die gewonnene DNA quantifiziert werden kann. Mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen (hier EvaGreen Dye), die während des PCR-Zyklus erfasst wird erfolgt die

Quantifizierung. EvaGreen ist ein Farbstoff der anfängt zu fluoreszieren wenn er DNA gebunden hat. Daher nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der synthetisierten PCR-Produkte zu und ergibt eine exponentielle Kurve, die nach mehreren Vermehrungszyklen in eine Plateau-Phase übergeht. Für die Bestimmung des DNA-Gehalts werden die Fluoreszenzwerte der exponentiellen Phase bei signifikanter Überschreitung eines definierten Schwellenwerts (für alle Messungen einheitlich) verwendet, dies ist der Ct-Wert ein hoher Ct-Wert zeigt das eine geringe Anzahl von cDNA Kopien im Ausgangsmaterial (RNA) vorhanden war, ein geringer Ct-Wert steht für eine hohe Initiale Kopienzahl.

Durch die Normalisierung auf ein Referenzgen (Endogene Kontrolle: Ein Gen mit sehr geringer Variation in der Expression, das für die geplanten Untersuchungen ermittelt wird.) nach der Vergleichenden Ct-Methode [69], wird eine Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Proben erzielt:

$$Ct_{\text{Ziel Gen}} - Ct_{\text{Endogene Kontrolle}} = \text{delta Ct}$$

Durch den Abgleich auf ein oder mehrere Referenzgene werden Probe zu Probe Variationen wie Zellzahl, RNA Qualität und Quantität ausgeglichen, da die Endogene Kontrolle für jede Probe (Extraktionsereignis) mitbestimmt wird. Für die qPCR wurde dann 2  $\mu$ L von der gewonnenen cDNA verwendet. Für die PCR wurde der SsoFast EvaGreen Supermix (BioRad) verwendet. Die Primersequenzen sind aus der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Marker	Primersequenz	PCR-Produkt (bp)
GAPDH for.	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC	452
GAPDH rev.	TTC ACC ACC CTG TTG CTG TA	452
Osteokalzin for.	CAT GAG AGC CCT CAC A	310
Osteokalzin rev.	AGA GCG ACA CCC TAG AC	310
Kollagen Typ 1 for.	AAA GGC AAT GCT CAA ACA CC	159
Kollagen Typ 1 rev.	TCA AAA ACG AAG GGG AGA TG	159
Cbfa1 for.	CCC CAC GAC AAC CGC ACC	388
Cbfa1 rev.	CAC TCC GGC CCA CAA ATC TC	388
Alkalische Phosphatase (ALP) for.	ACG TGG CTA AGA ATG TCA TC	475
Alkalische Phosphatase (ALP) rev.	CTG GTA GGC GAT GTC CTT A	475
Human Bone Sialo Protein (BSP) for.	AAG CAA TCA CCA AAA TGA AGA CT	188
Human Bone Sialo Protein (BSP) rev.	TGG AAA TCG TTT TAA ATG AGG ATA	188
Osteopontin for.	CCA AGT AAG TCC AAC GAA AG	347
Osteopontin rev.	GGT GAT GTC CTC GTC TGT A	347
Osteoprotegerin for.	AGA CTT TCC AGC TGC TGA	469
Osteoprotegerin rev.	GGA TCT CGC CAA TTG TGA	469
Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) for.	CAG GAG ACC TAG CTA CAG A	381
Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) rev.	CAA GGT CAA GAG CAT GGA	381

Tabelle 3: Primersequenzen der verwendeten Marker für die PCR

Es wurden von den einzelnen Proben 2  $\mu\text{L}$  cDNA entnommen, bis 10  $\mu\text{L}$  mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und mit 8  $\mu\text{L}$  SsoFast EvaGreen Supermix (enthält DNA-Polymerase, dNTPs,  $\text{MgCl}_2$  und Reaktionspuffer), 2x 1  $\mu\text{L}$  Primer Mix (enthält 10 pmol/ $\mu\text{L}$  Forward-Primer und 10 pmol/ $\mu\text{L}$  Reverse-Primer) versetzt.

Das PCR-Reaktionsprotokoll wurde folgendermaßen eingestellt:

- 1 x 2 min 95 °C (Initiale Denaturierung)
- 35 x 30 sec 95 °C (Denaturierung des Doppelstrangs)
- 30 sec 53 °C (Primerannealing)
- 30 sec 72-74 °C (Elongation durch die Taq-Polymerase)
- Hold bei 4 °C

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der Porositäten der Proben

Für die Bestimmung der Porosität und der Porengrößenverteilung sind licht- und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht worden, die gleichzeitig auch das Sinterverhalten der verschiedenen Ti-6Al-4V-Proben zeigen. Die Proben, die untersucht wurden, bestehen jeweils aus unterschiedlich großen Pulverpartikel (Pulverpartikelgröße  $\leq 45 \mu\text{m}$ ,  $45\text{-}63 \mu\text{m}$ , Mischung ( $125\text{-}180 \mu\text{m} + 10 \% \leq 45 \mu\text{m}$ ),  $125\text{-}180 \mu\text{m}$  und  $\leq 45 \mu\text{m} + 1 \% \text{Al}$ ). Sie wurden bei einer Sintertemperatur von  $1350 \text{ }^\circ\text{C}$  hergestellt.

Erwartungsgemäß ist zu erkennen, dass die Poren umso größer sind je größer die Pulverpartikel sind.

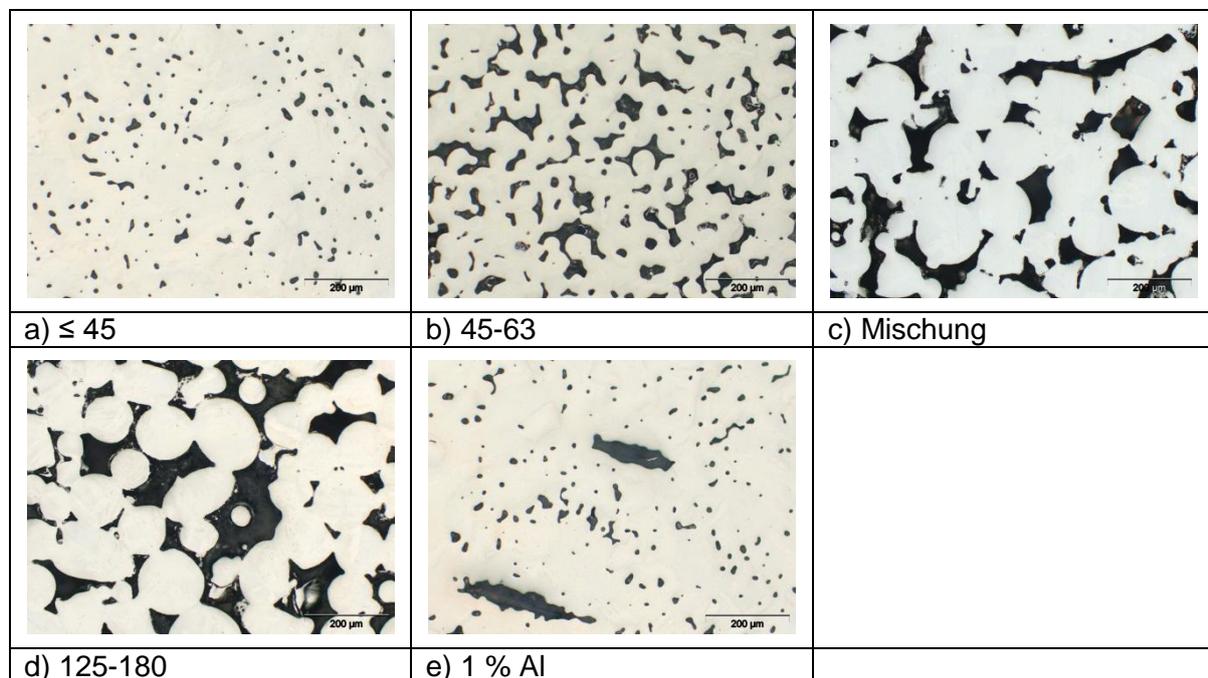


Abb. 2: Lichtmikroskopische Aufnahme 20x von der Oberfläche der Ti-6Al-4V-Probe

In Abb. 2 sind die Lichtmikroskopischen Aufnahmen der verschiedenen Proben abgebildet. Von a) bis e) werden die Schnittflächen der gesinterten Ti-6Al-4V-Proben der unterschiedlichen Porositäten bei 20 - fach Vergrößerung dargestellt. Auf der Probe  $\leq 45 \mu\text{m}$  Abb. 2 a sind die wenigsten Poren abgebildet. Die gesamte Probe ist fast vollständig versintert. Die Pulverpartikel sind ineinander übergegangen, so dass keine sphärische Pulverpartikel mehr zu erkennen sind. Im Vergleich zu den anderen Proben sind dort die kleinsten Porengrößen vorzufinden. Die Abb. 2 b zeigt die Schnittfläche der Probe  $45\text{-}63 \mu\text{m}$ . In der Aufnahme wird eine höhere Porosität als im vorigen Beispiel erkennbar. Die Umrisse der Pulverpartikeln sind gut erkennbar. Durch die größeren Pulverpartikel sind auch größere Poren entstanden, die ineinander übergehen und somit längliche Poren gebildet haben. Auf der Schnittfläche der Ti-6Al-4V-Probe, die aus einer Pulvermischung hergestellt wurde (Abb. 2 c) ist das Feinpulver  $\leq 45 \mu\text{m}$  vollständig mit dem groben Pulver  $125\text{-}180 \mu\text{m}$  versintert. Es sind hauptsäch-

lich große Poren vorzufinden. Auf der lichtmikroskopischen Aufnahme der Schnittfläche der Ti-6Al-4V-Probe 125-180  $\mu\text{m}$  in Abb. 2 d sind die größten Poren abgebildet. Da nur wenige Sinterhalse zu erkennen sind, wird von einer schlechten Versinterung der Partikel untereinander ausgegangen. Auf der lichtmikroskopische Aufnahme von der Ti-6Al-4V-Probe 1 % Al (Pulvergröße  $\leq 45 \mu\text{m}$  + 1 % Al) Abb. 2 e haben die Aluminiumfäden in der Probe große längliche Poren nach der Sinterung hinterlassen. Durch das Diffundieren des Aluminiums in der Ti-6Al-4V-Probe sind die länglichen Porenformen in der Probe entstanden. Die Ti-6Al-4V-Probe besteht nur dort aus extrem großen Poren, wo das Aluminium vorher seinen Platz hatte. Ansonsten sieht die Aufnahme wie die der Probe  $\leq 45 \mu\text{m}$  (Abb. 2 a) aus. Durch Betrachten der Proben wird erkennbar je Poröser die Proben sind, desto weniger Sinterhalse sind auf den Bildern zu sehen.

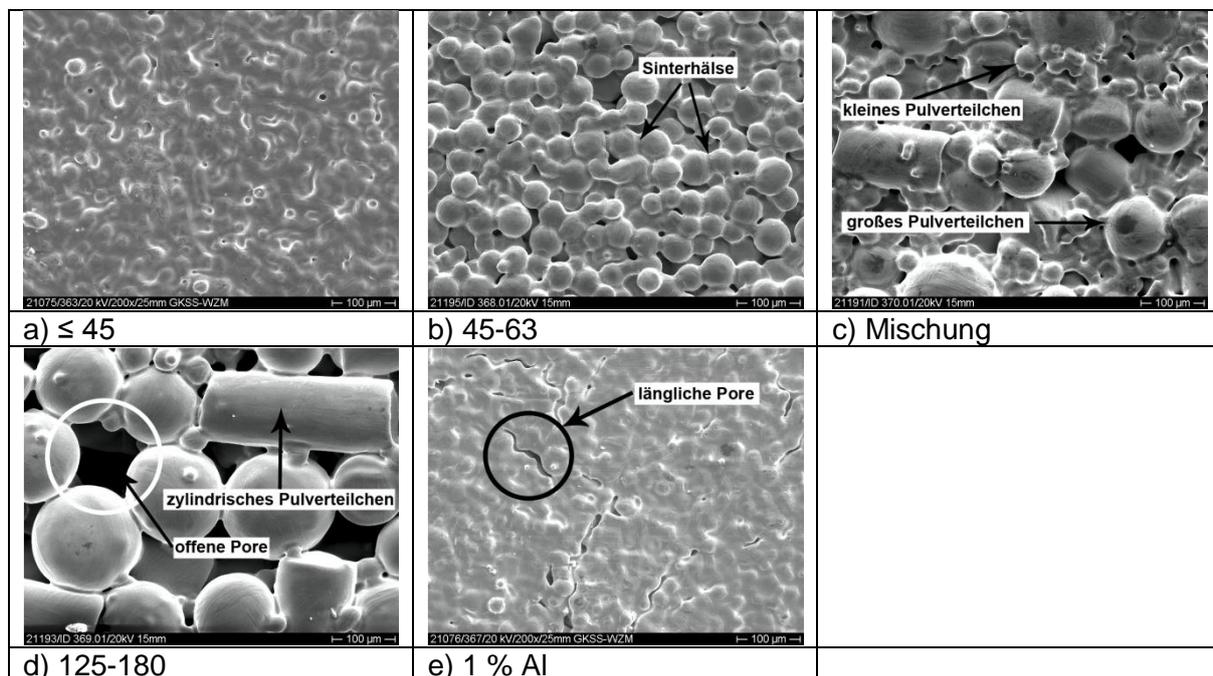


Abb. 3: REM-Aufnahme 20kv/200x/25mm von der Oberfläche der Ti-6Al-4V-Probe

Abb. 3 zeigt die Aufnahmen der unterschiedlichen Proben die mittels des Rasterelektronenmikroskops gemacht worden sind. Auf diesen Bildern ist die Versinterung der Teilchen untereinander deutlich sichtbarer als auf den Lichtmikroskopischen Aufnahmen. In Abb. 3a ist die höchste Versinterung der Teilchen erkennbar. Die sphärischen Pulverteilchen sind nicht mehr optisch auseinander zu trennen und einzeln zu bestimmen. Die Pulverpartikel sind in einander übergegangen und haben eine dichte Ebene gebildet. Es sind nur sehr wenige Poren vorzufinden. Die REM-Aufnahme (Abb. 3b) zeigt die Probe 45-63  $\mu\text{m}$ . Die ursprüngliche sphärische Pulverform ist sehr stark ausgeprägt vorzufinden. Es sind deutlich Sinterhalse zu beobachten. Das Bild zeigt offene Poren, die bis in die unteren Schichten verlaufen. Auf der REM-Aufnahme Abb. 3c bei der Mischung sind die Strukturen des Feinpulvers klar zu erkennen, das sich mit den groben Partikeln verbunden hat. Es sind noch offene Poren vorhanden. Das Bild zeigt zylinderförmige Pulverpartikel, was darauf zurückzuführen ist, dass das Ausgangspulver nicht nur aus sphärischen Pulverpartikeln bestand. Die REM- Aufnahme

Abb. 3d zeigt sehr große und viele offene Poren. Auch hier ist erkennbar, dass das grobe Ausgangspulver mit zylinderförmigen Partikeln durchsetzt war. Bei dieser Aufnahme werden die wenigen gebildeten Sinterhalse deutlich erkennbar. Auf der letzten REM-Aufnahme Abb. 3e ist die Probe 1 % Al abgebildet. Auf der Probe sind längliche Poren gebildet worden, die auf die Aluminiumfäden zurück zu führen sind.

## 4.2 Gesamte Porengrößenverteilung

In Abb. 4 sind die gesamten Porengrößenverteilungen aller Proben dargestellt. Erwartungsgemäß kann festgestellt werden, dass mit zunehmender Größe der versinterten Pulverpartikel auch größere Poren erzielt wurden. Die kleinsten Poren wurden auf der Probe  $\leq 45 \mu\text{m}$  entwickelt und die größten Poren auf der Probe 125-180  $\mu\text{m}$ .

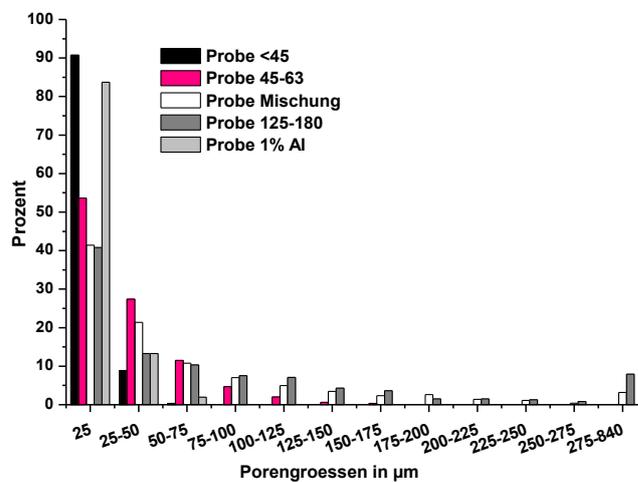


Abb. 4: Porengrößenverteilung der unterschiedlichen Ti-6Al-4V-Proben

Durch Betrachten der Abbildung wird deutlich dass die höchste Anzahl von Poren der Größe  $\leq 25$  auf der Probe  $\leq 45 \mu\text{m}$  gebildet worden sind. Sie sind bis zu 90 Prozent auf ihnen vertreten und reichen bis zu einer Größe von 75  $\mu\text{m}$ . Auf der Probe 45-63  $\mu\text{m}$  sind ebenfalls vermehrt Poren der Größe  $\leq 25 \mu\text{m}$  zu erkennen. Zusätzlich haben sich auf dieser Probe größere Poren gebildet, die bis zu einer Größe von 175  $\mu\text{m}$  zu finden sind. Bei der Probe Mischung sieht es anders aus. Die Probe besteht aus weniger als 50 Prozent aus Porengrößen  $\leq 25 \mu\text{m}$ . Dafür haben sich ca. 22 % Poren der Größe 25-50  $\mu\text{m}$  auf ihnen entwickelt. Die Verteilung der Poren reicht bis zur Größe 840  $\mu\text{m}$ . Die Porengrößenverteilung der Ti-6Al-4V-Probe mit der Pulvergröße 125-180  $\mu\text{m}$  ähnelt der Größenverteilung der Pulvermischung. Die Poren  $\leq 25 \mu\text{m}$  betragen ca. 41 %. Porengrößen zwischen 25-50  $\mu\text{m}$  sind mit einem Anteil von ca. 13 % vertreten. Auch hier können wie bei der Probe Mischung Poren bis zur Größe 840  $\mu\text{m}$  produziert werden. Der Anteil der Poren mit einer Größe von 840  $\mu\text{m}$  ist hier deutlich höher als bei der Mischung. Die Probe mit den Aluminiumfäden besteht im Wesentlichen und erwartungsgemäß auch nur aus Poren der Größe  $\leq 25 \mu\text{m}$  bis höchstens 100  $\mu\text{m}$ , wie es bei der Porengrößenverteilung bei der Probe  $\leq 45 \mu\text{m}$  zu sehen ist. Allerdings besteht die Probe nur ca. 83 % aus Poren von der Größe  $\leq 25 \mu\text{m}$  und etwas mehr (ca. 13 %) aus Poren zwi-

schen 25-50  $\mu\text{m}$  Größe. Im Vergleich zu der Ti-6Al-4V-Probe  $\leq 45$ , finden sich in der aluminiumhaltigen Probe auch einige Poren im Bereich 50-100  $\mu\text{m}$ .

Die verschiedenen Porositäten der unterschiedlichen Ti-6Al-4V-Proben werden in der Abb. 5 in Volumenprozent dargestellt. Die Werte sind durch zwei Verfahren ermittelt worden. Das erste Verfahren ist die geometrische Bestimmung und das zweite Verfahren die Ermittlung durch Adobe Photoshop. Beide Verfahren wurden gemittelt. Die höchste Porosität ist wie erwartet durch die größten Pulverpartikel entstanden. Es konnten Porositäten von ca. 5 - 35 % Vol.-% hergestellt werden.

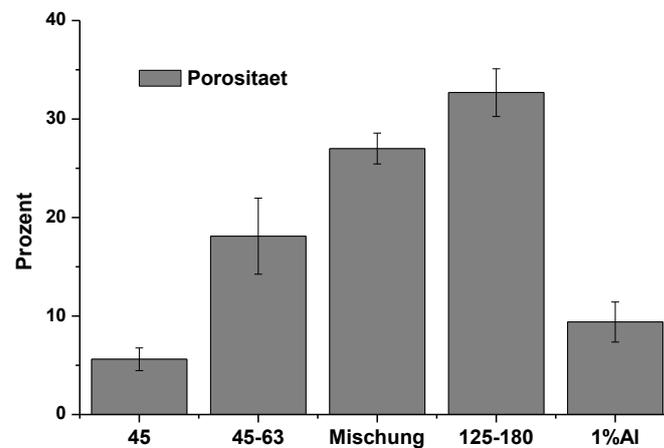


Abb. 5: Darstellung der unterschiedlichen Porositäten (Vol.-%) von Ti-6Al-4V

### 4.3 Biologische Charakterisierung der porösen Ti-6Al-4V-Proben

Der Charakterisierung der Viabilität ist mittels MTT und DAPI- Färbung durchgeführt worden. Für den Test wurden Osteoblasten und HUCPV Zellen verwendet. Die initiale Zellviabilität der adhärenen Zellen ist nach 1 h, 2 h und 4 h ermittelt worden.

#### 4.3.1 Initiale Adhäsion der Osteoblasten- und HUCPV-Zellen

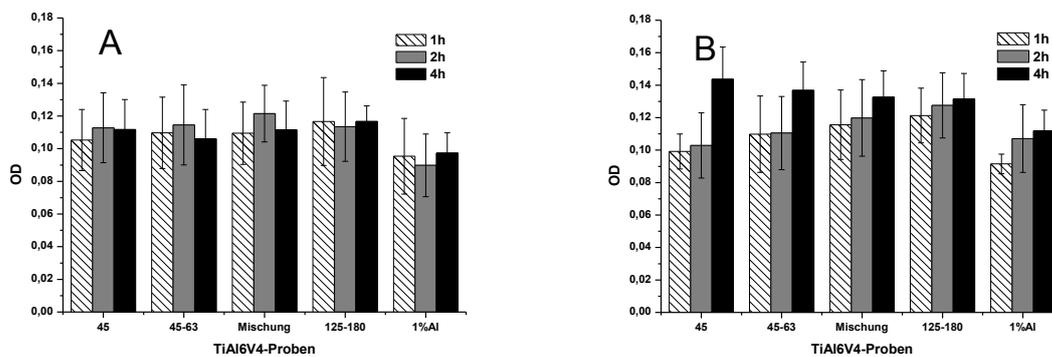


Abb. 6: Initiale Adhäsion der Osteoblasten (A) und der HUCPV-Zellen (B) auf den verschiedenen Ti-6Al-4V-Proben

In der Abb. 6.A sind nur geringe Unterschiede der Viabilität während der Adhäsionsphase der Osteoblasten zwischen den unterschiedlichen Proben erkennbar. Nur das Aluminium scheint für die Osteoblasten weniger verträglich zu sein, dort ist die Viabilität am niedrigsten. Eine alternative Interpretation ist, dass auf den Aluminiumhaltigen Proben weniger Zellen adhären. Da wir bei diesen kurzzeitigen Versuchen davon ausgehen, dass das Material zunächst nur die Adhäsion der Zellen beeinflusst, können wir schließen, dass die Zellen im Wesentlichen gleich gut auf dem aluminiumfreien Material haften. In Abb. 6.B ist zu erkennen, dass zunächst die Viabilität nach 1 h und 2 h bei der Mischung und der Probe 125-180  $\mu\text{m}$  am höchsten ist. Die Abbildung zeigt, je grober das Material, desto bessere Viabilitätswerte werden erreicht. Nur die HUCPV- Zellen auf dem Aluminium (1 % Al) weisen die niedrigsten Werte auf. Nach 4 Stunden steigt der Viabilitätswert drastisch auf allen Proben. Je länger die Inkubationszeit dauert, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Zellen vermehrt auf den Proben adhären können. Doch nach 4 Stunden Adhäsion zeigen die HUCPV-Zellen verglichen mit den unterschiedlichen Proben, die höchsten Viabilitätswerte auf der Probe  $\leq 45 \mu\text{m}$ . Auf der 1% Al-Probe wurde wieder die niedrigste Viabilität gemessen.

#### 4.3.2 Visualisierung der Zellkerne durch DAPI Färbung

Die Zellkerne der Osteoblasten und den HUCPV- Zellen, die auf den unterschiedlich porösen Ti-6Al-4V-Proben 1 h, 2 h und 4 h inkubiert wurden, wurden mit der DAPI- Lösung gefärbt. Dadurch wird es möglich, zu erkennen, wo die Zellen auf den Plättchen adhären.

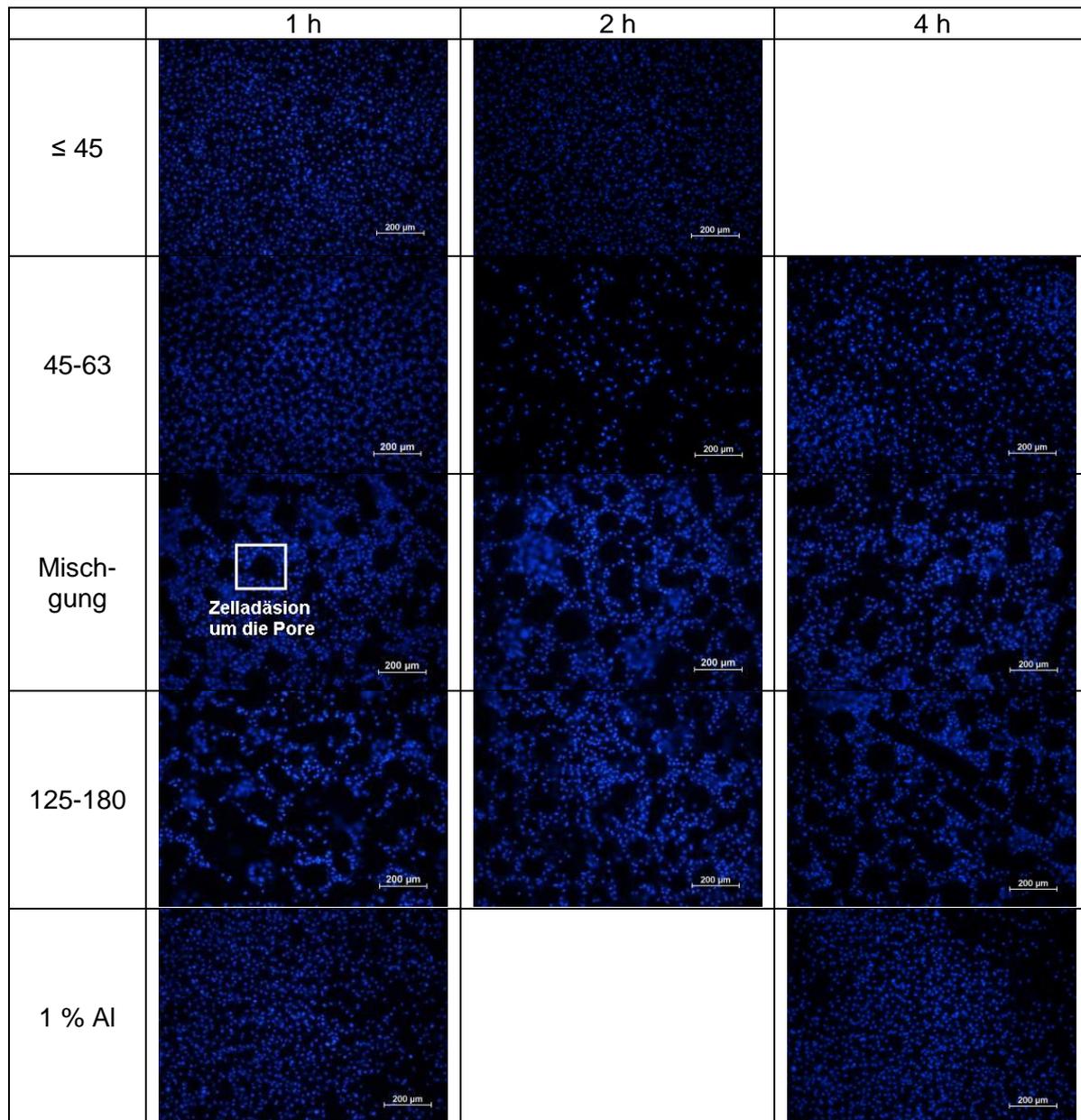


Abb. 7: DAPI-Färbung der Osteoblasten auf den unterschiedlichen Ti-6Al-4V-Proben nach 1 h, 2 h und 4 h Inkubation

Bei den Osteoblasten wird kein großer Unterschied in der Zelladhäsion zwischen den unterschiedlichen Zeitspannen erkennbar. Aufgrund der geringen Zellzahl bilden sich keine Osteoblastenanhäufungen. Sie bevorzugen auch schon nach einer Stunde, um die Poren herum zu adhären. Die Bilder der Proben ≤ 45 μm von der Zeitspanne 4 h und der Probe 1 % Al von der Zeitspanne 2 h fehlen, da die Probe nach einer gewissen Zeit ausgetrocknet sind, und somit kein mikroskopisches Bild gemacht werden konnte.

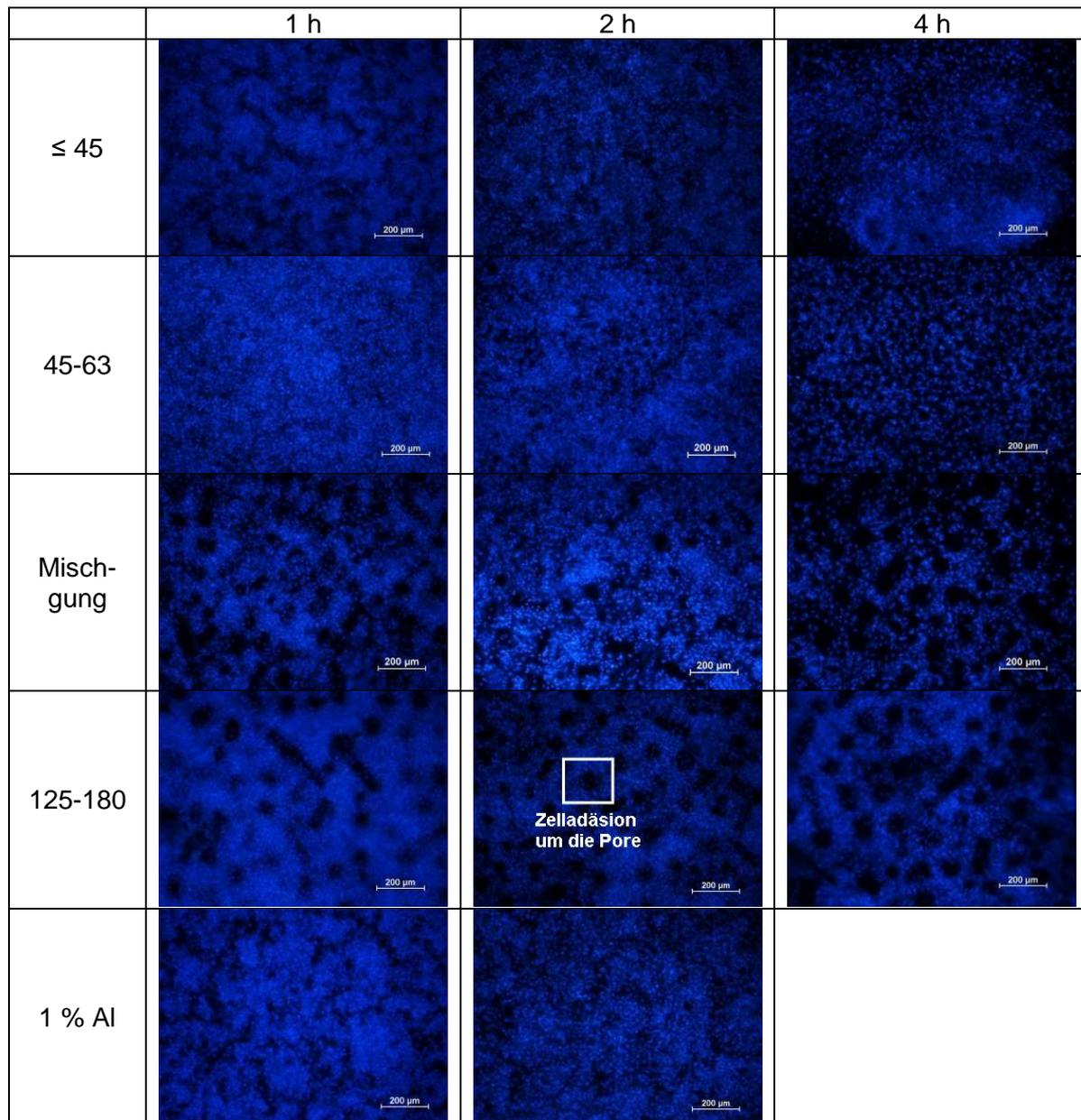


Abb. 8: DAPI-Färbung der HUCPV- Zellen auf den unterschiedlichen Ti-6Al-4V-Proben nach 1 h, 2 h und 4 h Inkubation

Bei der DAPI- Färbung der HUCPV- Zellen wird erkennbar, dass Zellen zunächst nach der 1. Stunde eher verklumpt adhären. Nach jeder weiteren Stunde verteilen sich die Zellen besser auf der Probe. Nach 4 Stunden scheinen die HUCPV- Zellen bevorzugt um die Poren, die größer als 100  $\mu\text{m}$  sind, herum zu adhären. Dieses Verhalten wird sehr gut bei den grobporigen Ti-6Al-4V-Proben sichtbar. Das Bild der Probe 1 % Al von der Zeitspanne 4 h ist nicht vorhanden, da auch hier die Möglichkeit nicht bestand eine mikroskopische Aufnahme von den Zellen zu machen. Die Probe mit den Zellen war in der DAPI-Lösung enthalten, die verdunstet ist.

### 4.3.3 Initiale Proliferation der Osteoblasten und HUCPV-Zellen

Die Proliferation der Osteoblasten ist wichtig, weil um das Implantat herum Knochen synthetisiert werden soll. Daher ist dies eine wesentliche Voraussetzung, um ein stabiles und dauerhaftes Einwachsen des Implantats zu erreichen.

Die Proliferationsfähigkeit der Osteoblasten und HUCPV-Zellen wurde auch mittels MTT untersucht. Die Zellen wurden für 30-45 Minuten auf den verschiedenen Plättchen adhärirt, danach für 5 Tage, 10 Tage und 15 Tage inkubiert und anschließend die Viabilität ermittelt.

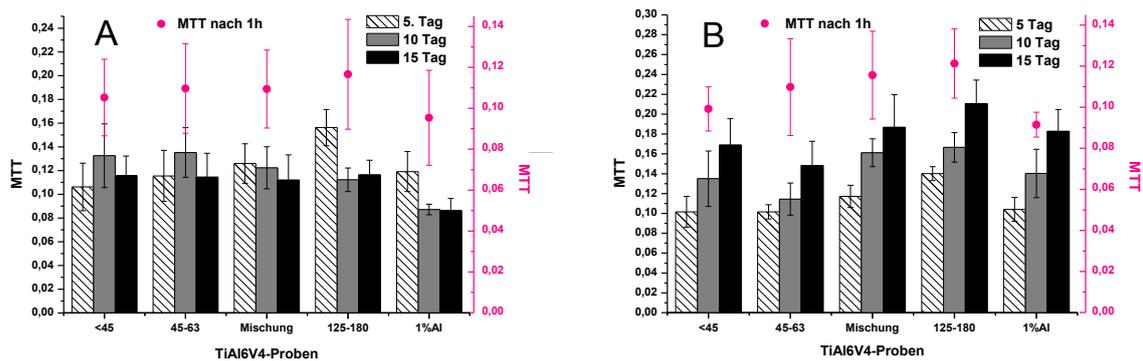


Abb. 9: Initiale Proliferation der adhärierenden Osteoblasten (A) und HUCPV-Zellen (B) nach mehreren Tagen im Vergleich nach 1 h Inkubation

Wenn die Osteoblasten auf den verschiedenen Proben verglichen werden, wird kaum ein Unterschied erkennbar. Allgemein lässt sich sagen, dass auf allen Probenkörpern konstant hohe metabolische Aktivitäten zu erkennen sind. Es lässt sich darauf schließen, dass die Zellen auf allen Oberflächen ein intaktes Wachstum haben. Einen erhöhten Anstieg der Viabilität ist auf den Proben 125 - 180  $\mu\text{m}$  am 5.Tag zu erkennen. Die geringste metabolische Aktivität ist auf dem 1 % Al zu beobachten, dort ist die niedrigste Viabilität ermittelt worden.

In Abb. 9.B ist die Initiale Proliferation der HUCPV- Zellen im Vergleich zu der Initialen Adhäsion der HUCPV-Zellen dargestellt. Das Zellwachstum verhält sich proportional zur Adhäsion. Je mehr Zellen zu Beginn auf den Proben adhärirt sind, desto höhere Viabilitäten sind auf diese wieder zu finden. Die höchste Viabilität zeigen die Zellen auf der Ti-6Al-4V-Probe 125-180  $\mu\text{m}$ . Die niedrigste Adhäsion ist bei der Probe 45-63  $\mu\text{m}$  zu erkennen. Eine Ausnahme ist bei der Probe 1 % Al zu sehen. Die Adhäsionswerte sind dort am niedrigsten doch die Proliferation ist dem der Probe  $\leq 45 \mu\text{m}$  gleichzustellen.

#### Differenzierungstest

Die Differenzierung wird durchgeführt, um den Einfluss des Materials auf die Differenzierung zu untersuchen. Dazu wurde die ALP, Osteokalzin und Osteopontinproduktion mit FärbelISA- und RT-PCR Methoden untersucht.

Für die verschiedenen Tests konnten zunächst jeweils 50 000 Osteoblasten- und HUCPV-Zellen auf die Ti-6Al-4V-Proben für 40 min adhäreren. Nach 10 Tagen im Nährmedium wur-

den sie dann in einem Differenzierungsmedium inkubiert. Nach der 2., 3. und 4. Woche der Differenzierungsphase wurden die Analysen durchgeführt.

#### 4.3.4 Parallelfärbung für Osteokalzin, Osteopontin und DAPI

Die Differenzierung der Osteoblasten und den HUCPV-Zellen auf den verschiedenen porösen Ti-6Al-4V-Proben sind nach 2 Wochen, 3 Wochen und 4 Wochen mittels einer Parallelfärbung (DAPI, Osteokalzin und Osteopontin) bestimmt worden.

##### Parallelfärbung der Osteoblasten

Durch den Antikörper der mit dem Farbstoff FITC ausgestattet ist, wird die Osteokalzin Produktion durch die grüne Farbe sichtbar. Das Osteopontin wiederum wird durch den Antikörper der mit dem Farbstoff Texas Red ausgestattet ist, sichtbar. Die Bilder wurden einzeln mit dem Fluoreszenzmikroskop mit unterschiedlichen Filtern mit der Vergrößerung 20 x fotografiert. Durch das Überlagern der einzelnen Bilder wird das Osteokalzin durch die gelbe Farbe auf den Bildern erkennbar. Es wurden nur die Bilder der Differenzierung von der 4. Differenzierungswoche in dieser Diplomarbeit eingebracht, da an den Bildern der anderen beiden Wochen (2. und 3. Woche) kein Unterschied zu erkennen war.

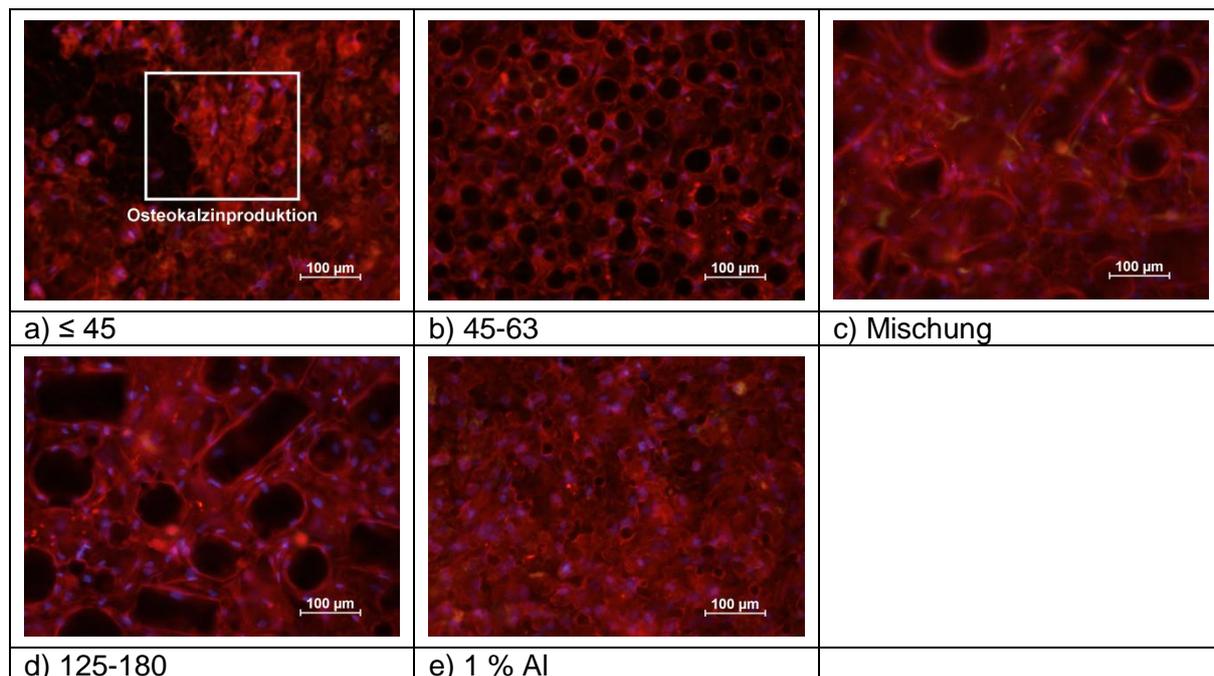


Abb. 10: Parallelfärbung der Osteoblasten auf den unterschiedlich porösen Proben nach 4 Wochen

Die Bilder zeigen, dass die Osteoblasten Osteokalzin und Osteopontin auf allen Proben gebildet haben. Osteopontin wurde von allen Zellen auf den Proben gebildet. Es ist auf der gesamten Probe verteilt, wo auch die Zellkerne zu sehen sind. Nur einige Zellen haben Osteokalzin gebildet, was durch die gelbe Färbung zu erkennen ist.

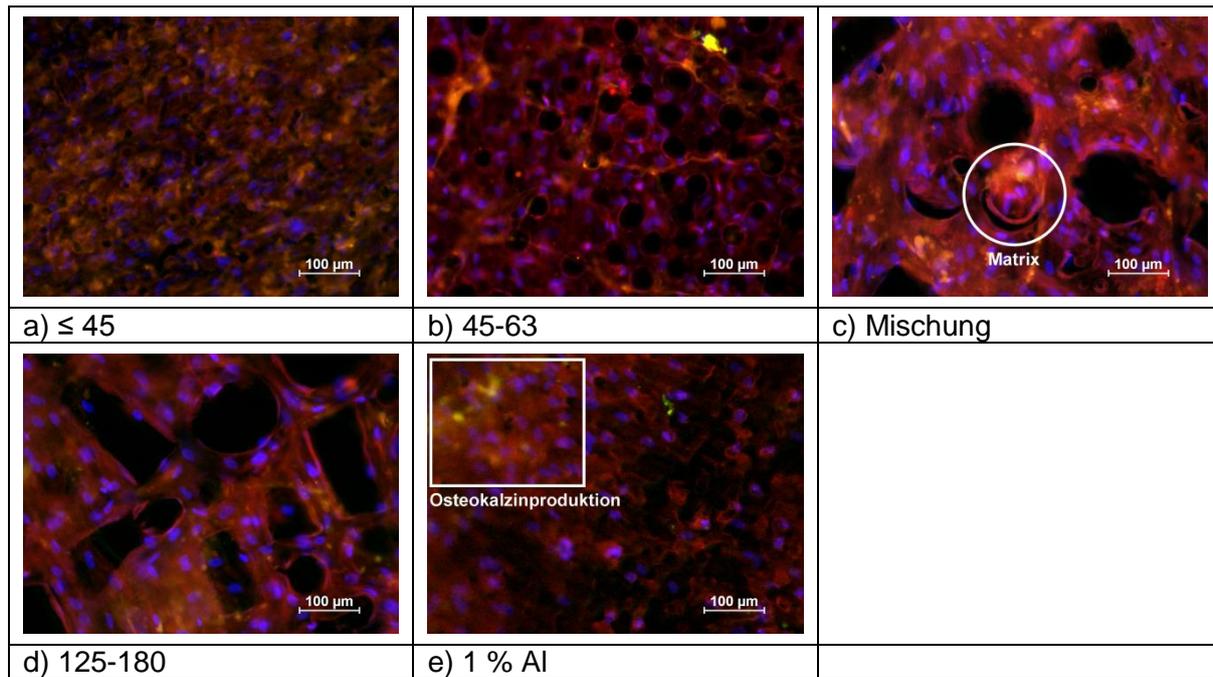


Abb. 11: Parallelfärbung der HUCPV-Zellen auf den unterschiedlich porösen Ti-6Al-4V-Proben nach 4 Wochen

Wie bei den Osteoblasten haben auch alle HUCPV-Zellen Osteopontin gebildet was an dem roten Farbstoff auf den Proben zu erkennen ist. Die Osteokalzinproduktion ist viel deutlicher und vermehrt bei den HUCPV-Zellen auf den verschiedenen Proben zu erkennen als bei den Osteoblasten.

#### 4.3.5 ALP Produktion von Osteoblasten und HUCPV-Zellen

Alkalische Phosphatase ist in großen Mengen im Skelettsystem zu finden. Sie gibt einen Einblick über die Knochenmatrixproduktion wieder. Um die ALP bestimmen zu können, wird der Überstand der zu testenden Proben mit den Zellen benötigt.

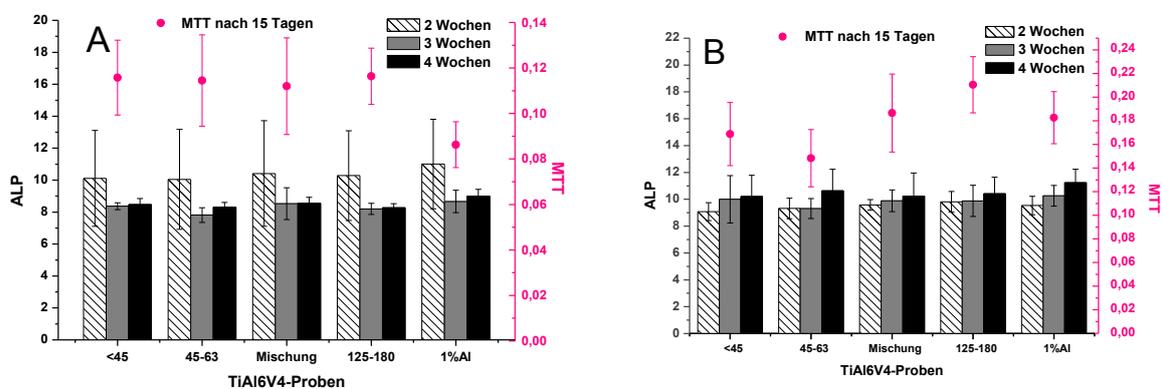


Abb. 12: ALP-Synthese von Osteoblasten (A) und HUCPV-Zellen (B) nach 2, 3 und 4 Wochen zum Vergleich mit der Viabilität nach 15 Tagen

Die Osteoblasten zeigen kaum einen Unterschied bei der ALP- Synthese. Wenn die Initiale Proliferation hinzu gezogen wird, ist an dem Diagramm erkennbar, dass die Osteoblasten auf

der Probe 1 % Al den geringsten Proliferationswert haben. Trotzdem ist die ALP-Synthese vergleichbar wie die der anderen Proben. Auf allen Proben ist ein deutlicher Anstieg der ALP-Synthese in der 2. Woche zu beobachten, die aber in den darauf folgenden Wochen abnimmt.

Die ALP-Synthese bei den HUCPV-Zellen zeigt keinen großen Unterschied zwischen den verschiedenen Proben, trotz des unterschiedlichen Wachstumsverhalten der unterschiedlichen Proben. Wenn die ALP - Produktion im Vergleich zu der Initialen Proliferation betrachtet wird, ist auf der Probe 45-63  $\mu\text{m}$  eine höhere ALP - Synthese vorzufinden. Auf der Probe 125 - 180  $\mu\text{m}$  wiederum die niedrigste Produktion. Bei allen Proben ist eine leichte Zunahme der ALP- Produktion zwischen der 2. - 4. Woche zu erkennen.

### 4.3.6 Osteokalzinproduktion der Osteoblasten und HUCPV-Zellen

Osteokalzin kann als biochemischer Indikator für den Knochenumsatz hilfreich sein. Osteokalzin wird im Knochen von reifen Osteoblasten gebildet und ist ein Teil der extrazellulären nicht kollagenen Knochenmatrix. Es macht etwa 10 - 20 % aller nicht kollagenen Proteine im Körper aus [44].

Für diesen Test wird der Überstand der zu testenden Proben benötigt. Es wurden die Osteokalzin-Werte nach 2 Wochen, 3 Wochen und 4 Wochen ermittelt.

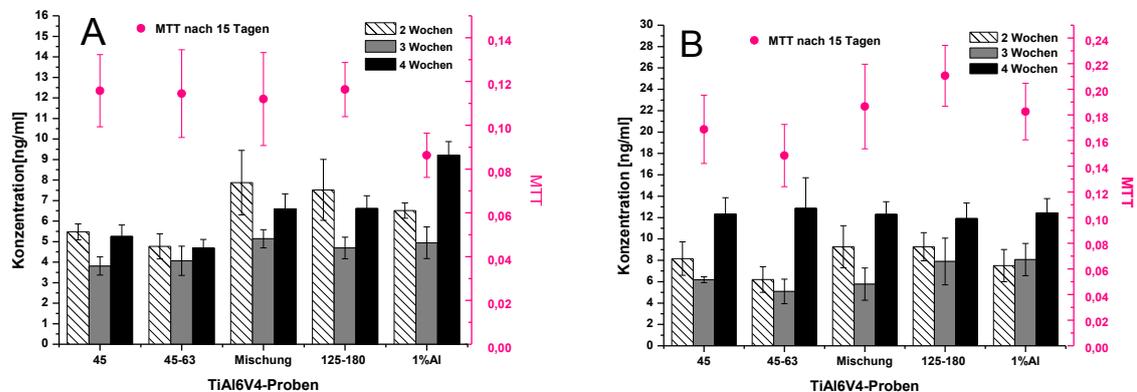


Abb. 13: Osteokalzin-Produktion von Osteoblasten (A) und HUCPV-Zellen (B) nach 2, 3 und 4 Wochen zum Vergleich mit der Viabilität nach 15 Tagen

Die Abb. 13.A zeigt deutlich, dass die Proben  $\leq 45 \mu\text{m}$  und  $45-63 \mu\text{m}$  die niedrigsten Osteokalzinwerte aufweisen. Auf den grobporigen Proben produzieren die Zellen vermehrt Osteokalzin. Zunächst sind die Osteokalzinwerte (bis auf das 1 % Al) in der 2. Woche am höchsten, danach sinken die Werte in der 3. Woche wieder ab. Ab der 4. Woche liegen die Werte wieder höher. Die Osteoblasten auf den Plättchen  $\leq 45 \mu\text{m}$  und  $45-63 \mu\text{m}$  haben ähnliche Osteokalzinwerte, genau wie die Proben Mischung mit dem  $125-180 \mu\text{m}$ . Die Osteoblasten produzieren zunächst auf der Mischung und dem  $125-180 \mu\text{m}$  Proben die höchsten Osteokalzin-Konzentrationen wie es in der 2. Woche zu erkennen ist. In der 4. Woche ist die Osteokalzin-Produktion der Osteoblasten, die auf den 1 % Al Plättchen wachsen, am höchsten.

Die HUCPV- Zellen (Abb. 13.B) verhalten sich auf allen Proben ähnlich, und zwar bilden sie zunächst in der 2. Woche mehr Osteokalzin als in der 3. Woche, doch dann steigt der Osteokalzinwert in der 4. Woche stark an. Die höchsten Osteokalzinwerte liefern die HUCPV- Zellen in der 2. Woche auf der Proben-Mischung und 125-180  $\mu\text{m}$ . Die Osteokalzinwerte sind in der 3. Woche bei dem 125-180  $\mu\text{m}$  und den 1 % Aluminium Plättchen am höchsten und am niedrigsten auf dem 45-63  $\mu\text{m}$  Plättchen. In der 4. Woche ist kein genauer Trend zu erkennen. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Proben sind statistisch nicht signifikant.

### 4.3.7 RT-PCR

Bei der quantitativen Real Time - PCR (qRT-PCR) wurden nur die Osteoblasten getestet. Die RT-PCR ermöglicht die Quantifizierung der gewonnenen cDNA und damit direkten Rückschluss auf die mRNA Expression. Bei der relativen Quantifizierung wurde als Referenz-Gen das „Housekeeping Gen“ GAPDH verwendet. Die zu untersuchenden Gene sind die Differenzierungsmarker ALP, OC, OPN und BSP, die Matrixbildenden Proteine Kollagen1 und cbfa1 und die Osteoklastendifferenzierungsfaktor RANKL und OPG [45][46].

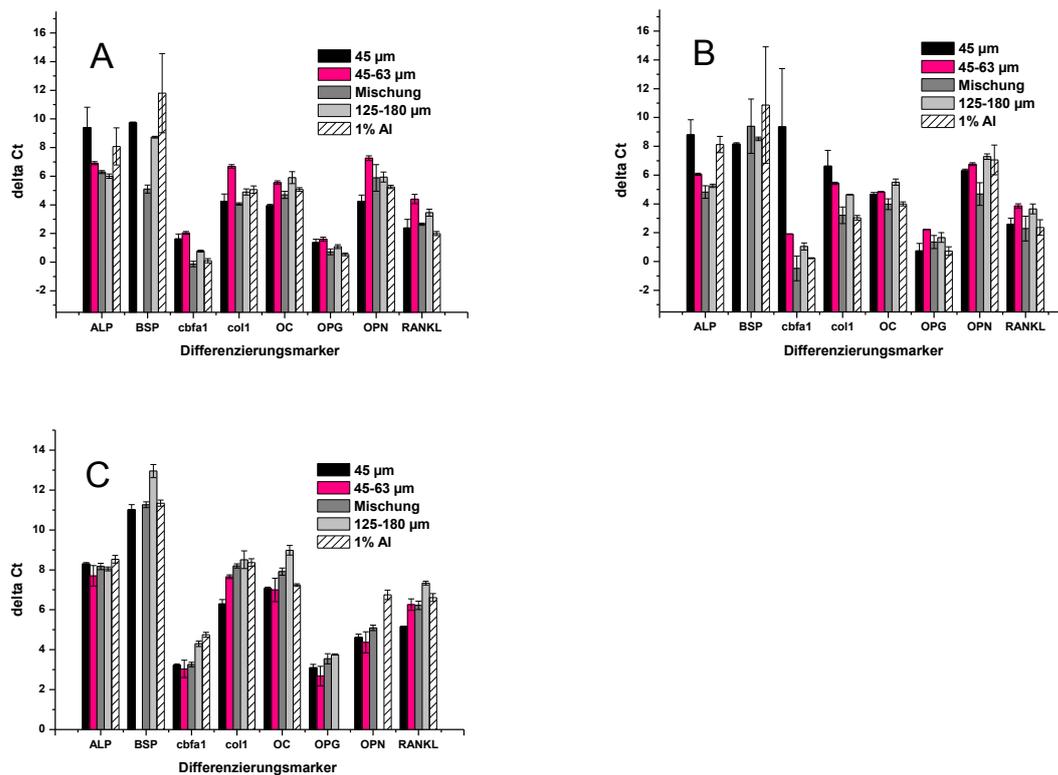


Abb. 14: Die Differenzierungsmarker ALP, BSP, cbfa1, col1, OC, OPG, OPN und RANKL normiert auf den endogenen Referenzgen GAPDH nach 2 Wochen (A), 3 Wochen (B) und 4 Wochen (C) Differenzierung

In der Abb. 14 sind die Differenzierungsmarker dargestellt die nach 2, 3 und 4 Wochen analysiert werden sollen. Die Osteoblasten zeigen auf allen Proben und an den verschiedenen Differenzierungswochen (2., 3. Und 4. Woche) das eine Expression stattgefunden hat. Bei

den ALP und cbfa1 Markern ist bei der Expression in der 2. (Abb. A) und 3. (Abb. B) Woche ein Trend zu beobachten, wie beim OPG in der 2. und 4. Woche. Die Osteoblasten haben eine stärkere Expression auf den höheren Porositäten. In der 4. Woche (Abb. C) ist bei dem ALP Marker auf allen Proben eine ähnliche Expression und bei dem cbfa1 eine stärkere Expression auf den feineren Proben beobachtet worden. Bei dem Osteokalzin Marker wird ein Trend in der 2. und 4. Differenzierungswoche wie beim col1 und RANKL (4. Woche) beobachtet und zwar ist die Expression bei den weniger porösen Proben höher. Nur beim OPG wurde in der 2. und 4. Woche eine stärkere Expression ermittelt. Bei den gesamten Genen ist aufgefallen das die Expression nach der 4. Differenzierungswoche im Vergleich zu den Differenzierungswochen (2 und 3) geringer ist. In der Abb. 14 (B) fehlt BSP von der Probe 45-63 und in Abb.14 (C) OPG von der Probe 1%Al, die RNA - Menge war zu gering, um die Proben testen zu können.

## 5 Diskussion der Ergebnisse

### 5.1 Porosität und Porengrößenverteilung

Ziel dieser Diplomarbeit war, ein Material zu entwickeln, welches einer Knochenstruktur ähnelt und es anschließend biologisch auf die Eignung als Implantatwerkstoff zu testen. Die Titanlegierung Ti-6Al-4V wird bereits als Implantat Material eingesetzt. Das neue hierbei ist die Porosität. Die Porosität eines Knochenmaterials ist von Bedeutung, um die Einwanderung von Zellen und Einsprossung von Gefäßen zu ermöglichen. Die Versorgung der Osteoblasten wird dadurch mit Nährstoffen gewährleistet. Durch die poröse Materialstruktur ist es aber auch möglich, dass ein Stoffwechsel z. B. in Form von Diffusion im Substanzinneren gewährleistet werden kann [35]. Parallel zu dieser Diplomarbeit wurden die mechanischen Eigenschaften der porösen Proben intensiv von Haithem Akaichi untersucht. Die Anordnung und die Verteilung der Poren können die mechanische Stabilität eines Konstrukts ändern und somit individuell den Belastungen im Empfängergebiet angepasst werden [35]. Die mechanische Charakterisierung ist deshalb von großer Bedeutung um das Einsatzgebiet des Materials für spätere Implantate definieren zu können. Die Ergebnisse seiner Arbeit sind in Tabelle 4 dargestellt.

Proben-Bezeichnung	Sinter-Temperatur	Porosität [Vol.%]	Zugfestigkeit $R_m$ [Mpa]	Dehngrenze $R_{p0,2}$ [MPa]	E-Modul [GPa]	Bruchdehnung A[%]
45-63 $\mu\text{m}$	1300 °C	15 $\pm$ 2	470 $\pm$ 6	390 $\pm$ 4	70 $\pm$ 6	1,80
125-180 $\mu\text{m}$	1300 °C	31 $\pm$ 3	143 $\pm$ 10	-	21 $\pm$ 6	0,18
Mischung	1300 °C	26 $\pm$ 2	277 $\pm$ 15	243 $\pm$ 10	40 $\pm$ 6	0,40
Ti-6Al-4V (kompakt)	-	3,5	960 - 970	744	110	13 - 16
Knochen	-	-	133	-	17	0,6

[14][55][56]

Tabelle 4: Mechanische Eigenschaften von MIM-Ti-6Al-4V ermittelt durch Zugversuche

Aus den Ergebnissen in der Tabelle 4 ist abzulesen, dass das E-Modul bei Erhöhung der Porosität dem des Knochens angenähert werden kann. Mit Erhöhung der Porosität nimmt allerdings die Stabilität (Zugfestigkeit, Dehngrenze und Bruchdehnung) wie erwartet ab. Vergleicht man das mit den entsprechenden Werten von kompakten Ti-6Al-4V, so sieht man große Unterschiede. Die Zugfestigkeit, Dehngrenze und die Bruchdehnung sind viel höher. Es gibt bisher nur wenige Angaben über das Optimum der Porosität in der Literatur. Umfangreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass zum Einwachsen von Knochen eine Porosität von 20-40 % vorhanden sein muss [49]. Da heutige Implantate aus der Probe  $\leq 45 \mu\text{m}$  bestehen und die Porosität nahezu gegen Null geht wird diese Probe als Kontrolle angesehen.

Die Ergebnisse dieser Diplomarbeit zeigen, dass es möglich ist, mittels MIM-Verfahren und der verwenden unterschiedlichen Pulverteilchengrößen Porositäten von 5 - 35 Vol.% herzu-

stellen und damit die mechanischen Eigenschaften zu beeinflussen. Die Probe Mischung und die Probe 125-180  $\mu\text{m}$  erfüllen den Porositätswert um ein Einwachsen von Knochen zu gewährleisten. Ab etwa 30 % Vol. Porosität nimmt der E-Modul ähnliche Werte an, wie sie für den Kochen gelten (eines Oberschenkelknochens beträgt 20GPa). Zudem wird auch die Porengrößenverteilung beeinflusst. Dies ist ein Parameter, der für die Wechselwirkung mit Zellen wichtig ist.

Durch den extremen Unterschied der Pulvergrößen sind 2 verschiedene Porenarten entstanden. Makroporosität wurde durch den Einsatz der Pulvergröße 125-180  $\mu\text{m}$  erreicht und Mikroporosität durch die Pulvergröße  $\leq 45 \mu\text{m}$ . Durch das MIM Verfahren sind Porengrößen zwischen 25  $\mu\text{m}$  - 840  $\mu\text{m}$  entstanden (siehe Abb. 4). Durch gezielte Auswahl der Pulvergrößen und Variation der Sintertemperatur kann also nicht nur die Porosität sondern auch die Porengrößenverteilung kontrolliert werden.

Unterschiedliche Experimente haben gezeigt, dass ein Bereich der Porengrößen von 75  $\mu\text{m}$  - 350  $\mu\text{m}$  als ideal angesehen werden kann, um das Einwachsen von Blutgefäßen und Knorpelgewebe zu ermöglichen [49]. Diese Porenverteilung wurde nur bei den Proben 125-180  $\mu\text{m}$  und der Mischung durch das MIM-Verfahren erreicht. Der Hauptanteil liegt dennoch bei der Porengröße 25  $\mu\text{m}$  auf beiden Proben. Bei der Mischung liegt dieser Porengrößenanteil, der als ideal angesehen wird, bei ca. 30% und bei der Probe 125-180  $\mu\text{m}$  bei ca. 35 %. Die anderen Proben die in dieser Forschungsarbeit verwendet wurden erfüllen nicht die ideal angesehene Voraussetzung. Der Einsatz der Aluminiumfäden in der Probe 1 % Al sollte größere Poren ermöglichen, dies ist gelungen. Die Probe zeigt ca. 200  $\mu\text{m}$  längliche Poren die aufgrund der Aluminiumfäden zurückzuführen sind. Diese sind in das Material diffundiert. Allerdings besteht kaum ein Unterschied zu der Probe  $\leq 45 \mu\text{m}$ . Der Anteil von Poren der Größe 25-50  $\mu\text{m}$  ist auf der 1 % Al Probe höher und es haben sich weiterhin ein minimaler Anteil Poren der Porengröße 50-75  $\mu\text{m}$  gebildet.

## 5.2 Initiale Zellviabilität der Zellen

### Adhäsion

Die gemessene Konzentration an Formazan korreliert mit dem Proliferationsverhalten der Zellen. Wenn wir davon ausgehen, dass alle Zellen gleich viel Tetrazoliumsalz in Formazan umsetzen können, dann können Vergleiche zur Lebensfähigkeit der Zellen auf den Proben gezogen werden. Dadurch kann ungefähr gesagt werden auf welcher Probe mehr Zellen adhären sind. Die Konzentration des katalytischen Produktes Formazan ist direkt proportional zur metabolischen Aktivität lebender Zellen [61]. Der MTT-Test erfasst nur ausschließlich lebende Zellen. Da die Proben aus dem gleichen Material (Ti-6Al-4V) bestehen, wird zunächst untersucht, ob die verschiedenen Porositäten eine Auswirkung auf das Adhäsionsverhalten der Osteoblasten und HUCPV-Zellen zeigen.

Die metabolische Aktivität der Osteoblasten ist auf allen Proben die aus Ti-6Al-4V bestehen nahezu gleich. Die Porosität zeigte keinen Einfluss auf die Zellviabilität der adhären Oste-

oblasten. Allerdings ist die geringste metabolische Aktivität auf der 1% Al Probe ermittelt worden.

Im Vergleich zu den Osteoblasten zeigen die HUCPV-Zellen leichte Unterschiede in der Viabilität auf den unterschiedlichen Porositäten die aus reinem Ti-6Al-4V bestehen. Je poröser die Probe desto höhere metabolische Aktivitäten der HUCPV-Zellen wurden ermittelt. Nach jeder weiteren Inkubationsstunde wurde ebenfalls ein Anstieg der Viabilität gemessen. Allerdings wurde auch hier wie bei den Osteoblasten die geringste Viabilität auf der 1% Al Probe gemessen.

Da die geringste Viabilität bei beiden Zelllinien auf der 1% Al Probe ermittelt worden ist, ist davon aus zu gehen, dass es an dem 1% Aluminium liegt. Bei den Osteoblasten und HUCPV-Zellen sind höhere Werte auf den reinen Ti-6Al-4V Proben gemessen worden. Die Porosität der Probe 1% Al liegt mit ca. 9,39 Vol.-% zwischen der Porosität der Probe  $\leq 45 \mu\text{m}$  mit ca. 5,61 Vol.-% und der Probe 45-63  $\mu\text{m}$  mit ca. 18,11 Vol.-%. Der Einfluss der Porosität auf die metabolische Aktivität der beiden Zelllinien auf der Probe 1% Al kann daher ausgeschlossen werden. Da die Größenverteilung der Probe 1% Al im Rahmen von 25  $\mu\text{m}$  bis 100  $\mu\text{m}$  ist, kann der Einfluss der einzelnen Porengrößen ebenfalls ausgeschlossen werden. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der Adhäsion, dass die Porosität der reinen Ti-6Al-4V-Proben auf die Osteoblasten keine Wirkung gezeigt hat doch bei den HUCPV-Zellen eine Steigerung der metabolischen Aktivität durch die höhere Porosität geführt hat. Da die geringste Viabilität bei beiden Zelllinien auf der 1 %Al Probe ermittelt worden ist und alle Proben aus dem gleichen Material Ti-6Al-4V bestehen, ist es möglich, dass das 1% Al eine Hemmung des Anheftens der Zellen an der Oberfläche der Proben bewirkt.

Bei der Betrachtung der mittels DAPI gefärbten Zellkerne, wird deutlich, dass die Osteoblasten wie auch die HUCPV-Zellen, um die Poren herum adhärieren. Beide Zellgruppen scheinen eine ebene Fläche zu bevorzugen, an denen sie sich fixieren können. Dies lässt sich anhand der mittel DAPI gefärbten Bilder von den Proben 45-63  $\mu\text{m}$ , Mischung und der Probe 125-180  $\mu\text{m}$  sehr gut erkennen.

Bei der Betrachtung der Bilder wird deutlich, dass die Osteoblasten keinen gravierenden Unterschied zwischen den einzelnen Inkubationsstunden (1 h, 2 h und 4 h) der gleichen Probe zeigen. Auf der Probe mit der geringsten Porosität (Probe  $\leq 45$ ) verteilen sich die Osteoblasten auf der ganzen Probe gleichmäßig. Da die Poren klein sind, können die Zellen sie einfach überbrücken. Aktive Osteoblasten sind ca. 30  $\mu\text{m}$  groß und die häufigste Porengröße auf der  $\leq 45 \mu\text{m}$  Probe liegt bei  $< 25 \mu\text{m}$  [11]. Die ersten Porenrisse sind schon auf der Probe 45-63  $\mu\text{m}$  zu erkennen. Dort fangen die Osteoblasten schon an, um die Poren zu adhärieren. Es befinden sich auch ca. 45% Poren der Größe  $< 25 \mu\text{m}$  auf der Probe. Diese Porengrößen sind womöglich bereits zu groß, als dass die Zellen darüber adhärieren können. Einen Unterschied bei der Probe 1% Al mit der Probe  $\leq 45 \mu\text{m}$  durch das 1 % Aluminium konnte nicht festgestellt werden.

Die HUCPV-Zellen zeigen keinen Unterschied bei der Adhäsion auf den Proben  $\leq 45 \mu\text{m}$  und dem 1% Al wie bei den Osteoblasten. Die Zellen sind hier allerdings nicht gleichmäßig ver-

teilt sondern treten in Häufungen auf. Betrachtet man die mittels DAPI- gefärbten Bilder scheint es, dass nach jeder weiteren Inkubationsstunde sich die Zellzahl verringert. Das widerspricht dem Ergebnis das mittels MTT ermittelt wurde. Dort stieg die metabolische Aktivität mit der höheren Porosität an. Da sich die HUCPV-Zellen schon beim trypsinieren in Häufchen geballt gelöst haben, könnten sie so auf die Proben gegeben worden sein, ohne sich voneinander gelöst zu haben. Durch die dichte Besiedlung der Oberfläche, könnten durch Brückenbildungen zwischen den Zellen möglicherweise die Poren überdeckt worden sein. Osteoblasten und HUCPV-Zellen wurden mit der gleichen Ausgangszellzahl auf die Proben angesetzt. Wenn die HUCPV-Zellen mit den Osteoblasten verglichen werden, ist ganz eindeutig zu sehen, dass mehr HUCPV-Zellen als Osteoblasten auf den Proben adhäreren. Das wird optisch sehr gut deutlich wenn die Probe 45-63µm mit Osteoblasten und die Probe 45-63µm mit HUCPV-Zellen verglichen werden. Im Vergleich sind auf der Probe 45-63µm der Osteoblasten klare Umriss der vielen Poren zu erkennen und bei den HUCPV-Zellen sind weniger Porenumrisse zu erkennen. Anscheinend können sich die HUCPV-Zellen leichter an der Oberfläche der Proben anlagern als die Osteoblasten

Die Zellen könnten doch in der Pore adhärert sein. Weil aber die Zellen in der Pore fixiert sind und diese Vielleicht zu tief ist, könnte die Fluoreszenz vom Material absorbiert worden sein und somit vom Fluoreszenzmikroskop nicht erfasst werden. Somit kann in den Poren die Fluoreszenz der Zellen nicht ermittelt werden und es entsteht der Verdacht, dass die Poren nicht mit Zellen besetzt sind. Um dies herauszufinden, müssten weitere Tests und Schichtaufnahmen mit dem FIB gemacht werden, um erkennen zu können, ob nicht doch Zellen in der unteren Schicht auf der Pore adhärert sind.

### **Proliferation**

Um die Proliferation der Zellen zu Untersuchungen wurde ebenfalls wie bei der Adhäsionsuntersuchung die Methode mit MTT gewählt. Der MTT ist eine indirekte Methode zur Zellzahlbestimmung und ist abhängig vom Zelltyp und der metabolischen Aktivität der Zellen. Das Verhältnis aus Zellviabilität zur Proliferation führt zu einer direkten Normierung der Lebensfähigkeit bezogen auf die Anzahl der tatsächlich adhärerenden Zellen, wenn davon ausgegangen wird, dass die metabolische Aktivität von allen Zellen gleich ist. Der Test erfasst ausschließlich lebende Zellen. Dabei hängt die Signalstärke vom Aktivierungsgrad der Zellen ab. Die mitochondrialen Dehydrogenasen weisen eine höhere Aktivität bei Proliferierenden Zellen als bei nicht proliferierende Zellen auf. Deshalb wird der Test nicht nur zur Messung von Viabilität und Zytotoxizität sondern auch für Zellproliferation verwendet. Da alle Proben aus derselben Titanlegierung Ti-6Al-4V bestehen außer der Probe 1% Al wird der Einfluss des Materials auf die Zellen ausgeschlossen. Somit können Vergleiche zur Viabilität und somit zur Proliferation der Zellen auf den unterschiedlichen Proben gezogen werden.

Anhand der Ergebnisse wurde festgestellt, dass die unterschiedlichen Porositäten auf den reinen Ti-6Al-4V Proben keinen Einfluss gezeigt haben. Eine niedrigere Viabilität wurde allerdings auf der Probe 1% Al gemessen. An den Tagen 10 und 15 sind die Viabilitätswerte auf den Proben Mischung, 125-180 µm und dem 1% Al niedriger. Das könnte bedeuten,

dass die Zellen differenziert sind. Die Matrixsynthese beginnt mit abnehmender Proliferation, die wiederum von der Mineralisierung gefolgt wird [67].

Bei den HUCPV-Zellen ist ein Trend zu erkennen. Je poröser die Probe desto höhere Viabilitätswerte wurde auf den reinen Ti-6Al-4V Proben gemessen. Bei der initialen Adhäsion wurde auch eine Viabilitätssteigerung mit Erhöhung der Porosität gemessen. Von Beginn an fördern die grobporigen Proben die metabolische Aktivität der Zellen. Die metabolische Aktivität der HUCPV-Zellen auf der 1% Al Probe ist gleichzustellen wie die der Zellen auf der Probe  $\leq 45 \mu\text{m}$  und der Probe 45-63  $\mu\text{m}$ . Die HUCPV-Zellen zeigen nicht wie bei den Osteoblasten die niedrigste Viabilität auf der Probe 1% Al. Für die niedrige Viabilität der Osteoblasten auf der 1% Al Probe könnte es deshalb zwei Gründe dafür geben. Entweder hat es mit der geringen Adhäsion von Beginn an auf der Probe zu tun, denn nur adhärierende Zellen sind fähig auf einem Substrat zu wachsen [47] oder das zusätzliche 1% Aluminium ist schlecht für die Osteoblasten. Porengrößen der Größe 75 - 350  $\mu\text{m}$  sollen die Proliferation der Osteoblasten begünstigen [49]. Wenn die Adhäsion nicht betrachtet wird, stimmt das Ergebnis bei den HUCPV-Zellen überein. Die Porengrößen der Mischung und der Probe 125-180 $\mu\text{m}$  sind in diesem Intervall und dort sind auch die höchsten Proliferationswerte ermittelt worden.

### 5.3 Zelldifferenzierung

Osteoblasten entstehen durch differenzielle Zellteilung aus Knochenvorläuferzellen. Sie synthetisieren in erster Linie die organischen Bestandteile der Knochensubstanz, Kollagen Typ 1, Osteokalzin, Proteoglykane und Enzyme, wie z.B. ALP [15][11]. Die Bildung von Knochen lassen sich in 3 Phasen unterteilen: der Proliferationsphase, Matrixreifung und die Mineralisationsphase. Als Marker für die Proliferationsphase gelten die Kollagenfibrillen von Typ 1. Bei der Matrixreifung des Osteoids gilt als Maß die hohe Konzentration der alkalischen Phosphatase. Die Mineralisierungsphase wird durch das Osteokalzin gekennzeichnet, was in der Matrix eingebaut wird. Zu Beginn dieser Phase werden Gene für Proteine wie OC und OP exprimiert [66][77].

Die Osteoblasten wurden vor Durchführung der Untersuchungen bis zu fünfmal passagiert. Zwischen der ersten und vierten Passage ist das Differenzierungspotenzial der Osteoblasten identisch. Durch das Überführen in Passagen verlieren in vitro gezüchtete Osteoblasten Eigenschaften der Differenzierung und somit ihre Fähigkeit mineralische Matrix zu bilden [62].

#### ALP

Ein relevanter Marker für die frühe Osteoblastendifferenzierung ist die vermehrte Expression von ALP. Die ALP Aktivität korreliert stark mit der Zelldichte der Osteoblasten. Wahrscheinlich beruht eine Aktivitätssteigerung auf vermehrte Zell-Zell Kommunikation, über sogenannte gap junctions, die zwischen den Zytoplasma Ausläufern zweier Zellen ausgebildet werden [11].

Die Osteoblasten zeigen keinen Unterschied bei der ALP-Produktion auf den verschiedenen Proben. Auf allen Proben ist ALP gebildet worden. Wenn die Proliferation mit einbezogen

wird, zeigen die Osteoblasten auf der Probe 1% Al die höchste Differenzierung. Diese ist wahrscheinlich auf den 1% Aluminiumfäden zurückzuführen. Diese scheinen die ALP-Produktion zu fördern. ALP steht für den Knochenaufbau und ist ein Maß für die Matrixreifung des Osteoids. Die Osteoblasten, die für diesen Test verwendet worden, sind zwischen Passage zwei und fünf. Es wäre möglich, dass die Differenzierung durch die höheren Passagen beeinträchtigt wurde. Normalerweise werden Osteoblasten bis Passage drei verwendet. Dies war hier allerdings nicht möglich, weil zu wenig Osteoblastenkulturen vorhanden waren.

Wie bei den Osteoblasten sind auch bei den HUCPV-Zellen kaum ein Unterschied bei der ALP-Produktion auf den unterschiedlichen Porositäten ermittelt worden. Im Bezug zur Proliferation wird hier deutlich, dass die Zellen auf den niedrigeren Porositäten des reinen Ti-6Al-4V Proben am stärksten differenziert sind. Da auf der 1% Al Probe nicht die niedrigste Proliferation stattgefunden hat ist es schwer zu deuten ob das Aluminium doch eine hemmende Wirkung auf die Osteoblasten ausgeübt hat oder ob doch die Porosität der Grund dafür war.

### **Osteokalzin**

Zu den hochspezifischen Markern der späten Osteoblastendifferenzierung gehört das Osteokalzin. Er ist ein extrazelluläres nicht kollagenes Matrixprotein, das von den Osteoblasten als letztes sezerniert wird und somit einen relativ späten Knochenmarker sowie Botenstoff darstellt. Osteokalzin wird nicht von allen Osteoblasten synthetisiert, sondern ist abhängig von dem Reifestadium und dem Alter der Osteoblasten [11][52][47]. Nach Aubin et al [52] setzt eine hohe Expression dieses Matrixproteins die Reife der Osteoblasten voraus. Somit lässt die deutlich zunehmende Expression Rückschlüsse auf eine hohe Anzahl reifer Osteoblasten zu. Mit der Steigerung der Expression wird eine weitere Mineralisierung der vorhandenen Matrix in vitro ermöglicht [52].

Die Osteoblasten haben auf allen Proben Osteokalzin gebildet. Die poröseren Proben führen zu einer Steigerung der Synthese dieses Proteins. Wenn die Proliferation mit einbezogen wird ist auch hier wie bei der ALP Produktion von einer stärkeren Differenzierung auf der Probe 1% Al von den Osteoblasten auszugehen.

Die HUCPV-Zellen zeigen eine höhere Osteokalzinproduktion auf den gröberen Proben in der 2. und 3. Differenzierungswoche. In der 4. Woche ist kein Unterschied zu sehen. Verglichen mit der Proliferation ist von einer stärkeren Differenzierung der Zellen auf der Probe 45-63 µm auszugehen.

Bei beiden Zelllinien schwanken die Osteokalzinproduktion zwischen den einzelnen Differenzierungswochen. In der 2. Woche sind höhere Werte ermittelt worden als in der 3. Woche. In der 4. Woche steigt wiederum die Osteokalzin Produktion enorm hoch. Es könnte in der 3. Woche ein Messfehler vorliegen, dass an dem Zellcounter oder an einem Pipettierfehler liegen könnte.

Wenn die Expression von ALP und Osteokalzin verglichen wird, zeigen die Osteoblasten ein unterschiedliches Verhalten. Während die Osteoblasten in der Expression beim ALP Test keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Porositäten gezeigt haben, ist bei dem Osteokalzin Test ein Unterschied in der Differenzierung festgestellt worden. Die Osteoblasten wiesen eine höhere Expression auf den grobporigen Proben und dem 1% Al auf. Bei den HUCPV-Zellen ist es anders. Bei beiden Testverfahren ist in der Expression der HUCPV-Zellen auf den verschiedenen Proben kein Unterschied festgestellt worden.

### **Parallelfärbung**

Ein weiterer Differenzierungstest ist die Parallelfärbung der Osteoblasten und der HUCPV-Zellen. Der Färbung wurde nach der 2. Woche, 3. Woche und 4. Woche durchgeführt. Die Parallelfärbung besteht aus der DAPI-, Osteokalzin- und Osteopontinfärbung.

In dieser Diplomarbeit wurde das Ergebnis der Parallelfärbung von der 4. Differenzierungswoche eingebracht, da zwischen den anderen beiden Differenzierungswochen (2. und 3. Woche) kein Unterschied in der Differenzierung festgestellt worden ist. Wenn das Ergebnis der Bilder von den Osteoblasten auf der Probe  $\leq 45 \mu\text{m}$  (Abb. 10a) und die der HUCPV-Zellen auf der Probe 1% Al (Abb. 11e) betrachtet wird, wird sehr gut erkennbar, dass nur an den Stellen wo ein Zellkern zu finden ist, auch Osteopontin gebildet wurde. An Stellen, die frei von Zellen sind, ist auch keine Fluoreszenz zu beobachten. Die Osteoblasten haben auf allen Proben Osteopontin und Osteokalzin gebildet (Abb. 10 und 11). Allerdings wird nicht erkennbar, dass die Osteoblasten auf den groberen Proben mehr Osteokalzin gebildet haben. Auch bei den HUCPV-Zellen zeigen die Bilder, dass Osteopontin und Osteokalzin auf allen Proben gebildet worden sind (Abb. 11). Der Vergleich zu den Osteoblasten zeigt, dass mehr HUCPV Zellen als Osteoblasten differenziert sind, da die Osteokalzinfärbung ausgeprägter zu erkennen ist. Durch die Osteopontinfärbung werden die Poren der Proben deutlich erkennbar. Dies ermöglicht, Zellen einzuordnen ob sie in den Poren adhärirt sind. Auf der Probe 125-180  $\mu\text{m}$  (Abb. 11d) ist zu erkennen, dass einige Zellen in die Pore oder über die Pore adhärirt sind, was man durch die Zellkern Färbung erkennt. Auf der Probe Mischung (Abb. 11c) hat sich eine Schicht über die Probe gebildet. Das könnte ein Anzeichen dafür sein, dass sich Knochenmatrix gebildet hat die sich über die Pore ausbreitet. Es gibt den Anschein, dass sie die Pore verschließt. Um genaueres darüber sagen zu können ob sich Knochenmatrix gebildet hat müssten weitere Test unternommen werden. Die Bilder bestätigen, dass sich auf allen Proben Osteokalzin gebildet hat, wie es auch mittels Osteokalzin Elise ermittelt worden ist.

### **Quantitative Real Time-PCR**

Die Real Time PCR bietet eine weitere Möglichkeit zum Nachweis von verschiedenen Knochenmarkern auf Genebene, die bei der Differenzierung gebildet worden sind. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Menge der produzierten Substanzen ermittelt werden kann. Aufgrund des Umfangs konnten für diesen Versuch nur die Osteoblasten untersucht werden. Für diesen Versuch wurden die Proben nach der Differenzierungswoche 2, 3 und 4 untersucht. Die verschiedenen Marker sollen eine Aussage über die Aktivität des Knochen-

stoffwechsels liefern. Dazu wurden als Marker des Knochenaufbaus Alkalische Phosphatase, Osteokalzin, Osteopontin und BSP verwendet. Für die Knochenmatrix-Synthese gelten als wichtiger Marker für Osteoblasten das col1. Ein Drittel der Matrix besteht aus organischen Substanzen die zu 90% aus Typ 1 Kollagen gebildet wird [16]. Cbfa1 ist ein essentieller Transkriptionsfaktor für die Osteoblasten-Differentiation [8]. Für die Knochenresorption ist RANKL und sein Gegenspieler OPG zuständig [71]. Osteoblasten die ausgereift sind werden durch die Bildung von Knochenmatrixproteinen wie col1, OP, OC und ALP gekennzeichnet [77].

Wenn man die Ergebnisse betrachtet, hat auf allen Proben an allen Differenzierungswochen eine Expression bei den verschiedenen Genen stattgefunden. Bei den Markern ALP, Cbfa1 und OPG ist ein Trend zu erkennen wobei die Osteoblasten eine stärkere Expression auf den groberen Proben haben. Die Marker col1 und RANKL haben eine stärkere Expression auf den niedriger Porösen Proben. In der 4. Woche nimmt die Expression bei allem Markern ab im Vergleich zu den anderen Differenzierungswochen. Wenn es zu einem abnehmende Wachstum der Zellen kommt beginnt die Matrixsynthese, die von der Mineralisierung gefolgt wird. Später kommt es z.T. zu einer Abnahme der Expression, während es dann in der Mineralisierungsphase zu vermehrter gen Expression gefolgt wird [67].

## 6 Zusammenfassung

Schätzungsweise leiden ca. 1% der Bevölkerung in den Westlichen Ländern z. B. an Gelenkschäden. Es werden ca. 500 000 Hüftimplantate weltweit implantiert, wobei die Implantate eine Lebensdauer von ca. 10 Jahren besitzen. Danach müssen die Implantate meist ausgetauscht werden weil es zu einer Lockerung des Implantates mit dem Knochen führt. Die Forscher versuchen ein Material herzustellen der die Eigenschaften des Knochens nachahmt. Eine Möglichkeit könnte das annähern des E-Moduls bringen. Um das Verwachsen der Knochenzellen mit dem Implantat gewährleisten zu können wäre eine Poröse Struktur von Vorteil. Ti-6Al-4V wird aufgrund seiner Biowerkstofflichen Eigenschaften bereits als Implantat eingesetzt.

Das Ziel dieser Arbeit war es poröses Ti-6Al-4V auf Bioverträglichkeit zu testen. Dazu wurden Proben mit verschiedenen Porositäten ( $\leq 45 \mu\text{m}$ , 45-63  $\mu\text{m}$ , Mischung, 125-180  $\mu\text{m}$  und 1% Al) mittels MIM-Verfahren hergestellt. Die Porosität und Porengrößenverteilung dieser Proben wurden im mechanischen Teil dieser Arbeit analysiert. Der Biologische Teil dieser Arbeit beinhaltet die Analysierung der Osteoblasten und HUCPV-Zellen. Dazu wurden verschiedene Test zur Adhäsion, Proliferation und der Differenzierung der Zellen durchgeführt. Die Adhäsion und Proliferation wurden mittels MTT-Test untersucht. Es wurde zusätzlich das Adhäsionsverhalten der Zellen untersucht, dadurch wurden die Zellkerne mittels DAPI-Lösung eingefärbt und analysiert. Die Differenzierung der Zellen erfolgte durch den ALP-Test, Osteokalzin- Elisa Test und durch eine Parallelfärbung durch FITC und Osteopontin. Weiterhin wurden die Expression für verschieden Differenzierungsmarker (ALP, OC, OPN, OPG, RANKL, col1 und cbfa1) durch die RT-PCR untersucht.

In der Literatur wurde beschrieben, dass eine Porosität von 20-40% und Porengrößen im Bereich 75-350  $\mu\text{m}$  vorhanden sein muss, um ein Einwachsen von Knochen gewährleisten zu können. Diese Voraussetzung konnten bei den Proben Mischung und 125-180  $\mu\text{m}$  angenähert bzw. erreicht werden. Bei der Untersuchung der Adhäsion und Proliferation zeigten die Osteoblasten wie die HUCPV-Zellen auf allen Proben metabolische Aktivitäten. Bei den Osteoblasten ist kein Einfluss auf die verschiedenen Proben festgestellt worden. Allerdings ist eine Steigerung der metabolischen Aktivität bei den HUCPV-Zellen auf den grob Porigen Proben ermittelt worden. Bei beiden Zelllinien ist bei der Untersuchung der Adhäsion eine geringere Viabilität auf der Probe 1% Al ermittelt worden. Der Differenzierungstest zur Untersuchung der ALP-Synthese hat gezeigt das beide Zelllinien auf allen Proben ALP produziert haben. Dabei ist weder bei den Osteoblasten noch bei den HUCPV-Zellen auf den verschiedenen Proben ein Unterschied bei der ALP-Produktion festgestellt worden. Osteoblasten und HUCPV-Zellen zeigten auf allen Proben eine hohe Osteokalzin-Produktion. Eine Steigerung der Osteokalzin-Synthese ist auf den groben Proben wie bei den 1% Al bei den Osteoblasten gemessen worden. Dies ist auch bei den HUCPV-Zellen zumindest in der 2 und 3 Differenzierungswoche zu beobachten. Bei der Genexpression Untersuchung mittels RT-PCR wurden aus zeitlichen Gründen nur die Osteoblasten getestet. Auf allen Proben wurde bei allen Differenzierungsmarker eine Expression gemessen, die in der 4. Woche abnahm.

Ziel dieser Diplomarbeit war es ein Material herzustellen der die idealen Eigenschaften des Knochens angenähert werden kann. Durch die Porosität konnten die idealen Porengröße wie die ideale Porosität, die für das Einwachsen des Knochens wichtig sind durch die Proben Mischung und 125-180  $\mu\text{m}$  erzielt werden. Auch die Biologischen Versuche für Osteoblasten und HUCPV-Zellen haben keine toxischen Auswirkungen der Porosität auf die Zellen gezeigt. Auf allen Proben wurden Expressionen für die Differenzierung gemessen. Meine Ergebnisse zeigen, dass die verschiedenen Porösen Proben als Implantat durchaus geeignet sind, um das Einwachsen von Zellen zu ermöglichen.

## Literaturverzeichnis

- [1] Sabrina Puckett, Rajesh Pareta and Thomas J. Webster, Nano rough micron patterned titanium for directing osteoblast morphology and adhesion. *International Journal of Nanomedicine* (2008:3(2)229-241)
- [2] <http://www.endoport.de/revisionsoperationen>, 2011
- [3] <http://www.medfuehrer.de/225,54,4/AktuelleThemen/Orthopaeden-Unfallchirurgen-Rheuma/Endoprothetik.html> , 2011
- [4] <http://de.wikipedia.org/wiki/Endoprothese>, 2011
- [5] <http://www.implantate.com/lexikon/osteoblasten.html>,  
<http://medikamente.onmeda.de/glossar/O/Osteoblasten.html>, 2012
- [6] U.Meyer, A. Büchter, H.P. Wiesmann, U. Joos and D.B.Jones (2005). Basic Reactions of Osteoblasts on Structured Material Surfaces. *European Cells and Materials* Vol.9.2005 (page 39-49). Department of Cranio-Maxillofacial Surgery, University of Münster, Germany-Biomineralisation research unit-Institute for Experimental Orthopaedics and Biomechanics, University of Marburg, Germany
- [7] <http://de.wikipedia.org/wiki/Osteopontin>, 2012
- [8] Regine Ortlepp, Expression und Regulation von BMP 2,4,5, Osteocalcin, Bone Sialo Protein und Alkalischer Phosphatase in primären Osteoblasten-Zellkulturen und Leukozyten von Patienten mit Hypo- und Hyperphosphatasie, Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller Universität Jena
- [9] Haithem Akaichi, Herstellung und Eigenschaften von porösen Komponenten aus Ti-Al6V4 mittels MIM, Diplomarbeit, Mai 2010
- [10] <http://www.eticur.de/de/familienbereich/stammzellen/nabelschnurblut.html>, 2012
- [11] Cathrin Hemmerling, Vergleichende Untersuchungen des Wachstums humaner Osteoblasten und humaner mesenchymaler Stammzellen (MSC's) auf  $\beta$ -Trikalziumphosphat nach Kultivierung im Brutschrank und in der Perfusionskammer, Medizinische Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 2007
- [12] <http://www.interpharma.ch/biotechlerncenter/de/Stammzellen.asp>, August 2011
- [13] <http://www.patent-de.com/20110310/DE102009041885A1.html>, 2012
- [14] Alfred Berger, Robert Hierner, *Plastische Chirurgie, Grundlagen Prinzipien Techniken*, Springer Verlag 2003
- [15] Stefan Voß, Veränderungen des Knochens in Abhängigkeit der Strahlendosis in Bezug auf die Insertion enossaler dentaler Implantate, Medizinische Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, 2006
- [16] Erwin-Josef Speckmann, Jürgen Hescheler, Rüdiger Köhling, *Physiologie*, Urban & Fischer Verlag, 5. Auflage 2008

- [17] H. Prenner, Bachelorarbeit - Ist es möglich Osteoporose durch den Lebensstil vorzubeugen?, Studiengang Gesundheits- und Pflegewissenschaften (BScN), Medizinische Universität Graz, 19.10.2009
- [18] <http://www.sumobrain.com/patents/wipo/Bone-implant-set-production-implants/WO2008064672.html>, 2012
- [19] <http://lgrzh.educanet2.ch/sw05/implmed/?8>, 05/10
- [20] <http://www.arthro-uerdingen.de/hueftTEP.html> 05/10
- [22] <http://www.dr-gumpert.de/html/huftoperation.html>, 08/11
- [23] E. Eisenbarth, J. Breme, H.Hildebrand, Einfluss des Vanadiumgehalts von Ti-Al-V-Legierungen auf Zelladhäsion und Biokompatibilität, Biomaterialien 2(4), 2001
- [24] K. Kramer, Metallische Implantatwerkstoffe ein Überblick, Biomaterialien 2 (4), 2001
- [25] M. Peters, C. Leyens, Titan und Titanlegierungen, Wiley-VCH Verlag GmbH und Co. KgaA, 2002
- [26] <http://www.form-technik.biz/technik/Steifigkeit.pdf>, 2012
- [27] V.Ventzke, F.Torster, G. Çam, M.Koçak, Biologisch verträgliche Werkstoffe in der Medizintechnik und Endochirurgie, GKSS 97/E/49
- [28] [http://www.tls-technik.de/d\\_2.html](http://www.tls-technik.de/d_2.html), 08/11
- [29] Pulvermetallurgie, Technologien und Werkstoffe Werner Schatt, Klaus Peters, Bernd Kiebach, Springer 2007
- [31] Th Ha Nguyen, Untersuchungen zum Fügen von Metallspritzgussverfahren hergestellter Ventilkomponenten, 2007
- [32] M. Strampe, Doktorarbeit - Optimierung der Lagerung von Wirbelschrauben während der Entbinderung und Sinterungsprozesse beim Pulvermetallurgischen Spritzgießen, 2003
- [34] T. Ebel, W.Limberg, Das MIM Labor im Institut für Werkstoffforschung, Stand: 01 April 2006, GKSS Bericht-Nr. 1. KW.01.WTN 1307
- [37] Fraunhofer Institut für Fertigungstechnik und Materialforschung, Schulungsunterlagen "Technologietransfer für das MIM von Titan und Titanlegierung", 07/99
- [38] <http://www.biocompare.com/ProductDetails/999619/Cell-Proliferation-MTT-Assay-kit.html>, 2010
- [39] [http://www.goek.tu-freiberg.de/oberseminar/OS\\_09/Katja\\_Nitzsche.pdf](http://www.goek.tu-freiberg.de/oberseminar/OS_09/Katja_Nitzsche.pdf)
- [40] C. Hemmerling, Dissertation - Vergleichende Untersuchungen des Wachstums humaner Osteoblasten und humaner mesenchymaler Stammzellen (MSC's) auf  $\beta$ -Trikalziumphosphat nach Kultivierung im Brutschrank und in der Perfusionskammer, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br., 2007

- [41] Eva Johanna Hübner, Sequentielle Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen zur Regeneration von Knochen als Imitation der enchondralen Ossifikation, Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br., 2010
- [44] [http://www.teco-medical.ch/downloads/pdf/DE\\_8002\\_Metra\\_Osteocalcin.pdf](http://www.teco-medical.ch/downloads/pdf/DE_8002_Metra_Osteocalcin.pdf), 08/11
- [45] <http://www.gene-quantification.de/pfaffl-biospektrum-2004.pdf>, 08/11
- [46] <http://www.kup.at/kup/pdf/6512.pdf>, 08/11
- [47] Sandra Christine Schmitt, Besiedlung verschiedener Biomaterialien mit Osteoblasten aus dem Unterkiefer von Schafen, Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, 2005
- [49] U. Van Osten, A. Salito, F. Breme, M. Aits, K. Hufnagel, GfE Metalle und Materialien GmbH, Sulzer Metco AG, Maßschneidern poröser Titanschichten für die zementfreie Implantationstechnik, Nuremberg, Deutschland, Wohlen, Schweiz
- [52] Brickwedde, Khatarina, Osteoblasten-Mikromassenkultur, Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, 2007
- [53] <http://wdb.ebb1.arch.tu-muenchen.de/metalle.php?doctype=2&id=1&gruppe=1>, 2012
- [54] <http://www.alu-verkauf.de/Werkstoffe>, 2012
- [55] S. Lohmann, Dissertation - Eigenschaften biologischer Materialien zur Simulation menschlicher Bewegung Funktionell-anatomische Grundlagen und Materialeigenschaften zur Erstellung dreidimensionaler Körpermodelle im Computer, Universität Konstanz, 2005
- [56] [http://e3.physik.uni-dortmund.de/~suter/Vorlesung/Medizinphysik\\_06/2\\_Folien.pdf](http://e3.physik.uni-dortmund.de/~suter/Vorlesung/Medizinphysik_06/2_Folien.pdf)
- [57] S. Jänich, Dissertation - Optimiertes Protokoll zur Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen aus embryonalen Stammzellen und deren angiogene Charakterisierung in vitro und in vivo, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, 2009
- [58] J. Rösler, C. Siemers, Fachlabor Titan und Titanlegierungen, Institut für Werkstoffe , Technische Universität Braunschweig, 2008
- [59] [http://www.tls-technik.de/d\\_2.html](http://www.tls-technik.de/d_2.html)
- [60] Frank, Evaluation of short-term effects of rare earth and other elements used in magnesium alloys on primary cells and cell lines, F. Feyerabend, J. Fischer, J. Holtz, F. Witte, R. Willumeit, H. Drückere, C. Vogt, N. Hort, Acta Biomaterialia 6 (2010) 1834-1842
- [61] <http://www.baltic-analytics.de/index.php?id=39>
- [62] J. Kelderman, Die PowerPlate, Hochschule Groningen, Anwendungsbeobachtung, Oktober 2001
- [63] [http://flexikon.doccheck.com/Extrazellul%C3%A4re\\_Matrix](http://flexikon.doccheck.com/Extrazellul%C3%A4re_Matrix)

- [64] <http://de.wikipedia.org/wiki/Stammzelle>
- [65] <http://www.dmsg.de/multiple-sklerose-news/index.php?w3pid=news&kategorie=forschung&anr=2250>
- [66] K. Dörner, Klinische Chemie und Hämatologie, Georg Thieme Verlag, 2009
- [67] D. Ganten, Molekularmedizinische Grundlagen von Endokrinopathien, Springer Verlag, 2001
- [68] Karina Friesen, Proliferations-Differenzierungs-und Adhäsionsverhalten osteogener Zelllinien auf unterschiedlichen Knochenersatzmaterialien, Dissertation: Der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2006
- [69] Michael Walter Pfaffl, Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung, Lehrstuhl für Physiologie, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung Umwelt Freising, Bio spektrum-1/04-10. Jahrgang
- [70] Klinische Anwendungsmöglichkeiten von porösen Biomaterialien im Knochengewebe; S.A. Esenwein, S. Esenwein, C.-H. Hartwig, G. Muhr; Mat.-wiss. U. Werkstoff-techn.2004, 35, No. 4; 2004 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- [71] Osteoprotegerin-ein neuer Laborparameter zur Unterstützung der radiologischen Diagnostik rezenter Frakturen? W.Krampla, S. Newrkla, K.Huber,G.Hawa,M.Posch, S.Fendt, I.Katschnig, A. Kröner, E. Hayden, E.Kittl, R. Eyb, W. Hruby; J.Minor. Stoffwechsel 2/2007
- [72] S.G Steinemann, Titan als Metall der chirurgie, Biomaterialien, 2001
- [73] Ulrich Fink, Metallische Werkstoffe für orthopädische Implantate, Biomaterialien 2 (2) 2001
- [74] Zementfreie Funktionsoberflächen für Titanimplantatwerkstoffe; Ulrich Holzwarth; Biomaterialien 2 (4), 2001
- [75] Oberflächenbehandlungen von Titanwerkstoffen für biomedizinische Implantate; B. Rauschenbach, S. Mändl, J.K.Gregory, R.Sader, D.Krause, W. Assmann, E.Steinhauser; BIOMaterialien 2(4), 2001
- [76] Untersuchungen zur Verbesserung der Verschleißbeständigkeit von Titanwerkstoffen; J.Breme, F. Aubertin, M. Bram, M. Hamentgen; BIOMaterialien 2 (4), 2001
- [77] <http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/2005/ponce/ponce.pdf>

## Anhang

### Verwendete Materialien

#### Probenherstellung:

##### Material und Chemikalien

Ausstanzwerkzeug	Drop forged 8 von Turnus Made in Germany
Demotec 30	Demotec Siegfried Demel, Nidderau, D
Lupolen V	V2920K, Elenac
Paraffinwaxse	Merck KGaA, Darmstadt, D
Pulver $\leq 45 \mu\text{m}$	TLS Technik GmbH & Co. Spezialpulver KG, Bitterfeld, D
Pulver 45-63 $\mu\text{m}$	TLS Technik GmbH & Co. Spezialpulver KG, Bitterfeld, D
Pulver 125-180 $\mu\text{m}$	Helmholtz-Zentrum Geesthacht, D
Stearinsäure	Merck KGaA, Darmstadt, D

##### Laborgeräte und Messinstrument

Adobe Photoshop	Adobe Systems GmbH
AnalySIS Programm	AnalySIS Pro imaging software, Hersteller Olympus
Chemischer Entbinder	LÖMI Typ: LRA-50/EBA-50
Entbinderungs-Sinterofen XVAC	Xerion Ofentechnik GmbH
Glovebox-Waage	AND GF-3000
Glovebox	m Braun, UNILab PLC Control Panel
Lichtmikroskop Metalographie	Leica MZ 95
Messschieber	Mahr Typ:16EX
Rasterelektronenmikroskop	DSM962, Zeiss
Schaufelknetter	Femix Schaufelknetter Typ KM0.5
Schleifmaschine	Tegrapol-35, Struers
Sinterofen	Xerion
Spritzmaschine	MTT-100KSA, MCP-Injection Moulding HEK-GmbH

#### Biochemischer Teil:

##### Material

Einwegpipetten	TPP, Trasadingen, Ch
Eppendorf Multipipette	Eppendorf AG, Hamburg, D
Eppendorfpipette	Eppendorf AG, Hamburg, D
Gefilterte Pipettenspitzen	Sorensen

Kryo-Tube	Sarstedt
Küvette	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pasteurpipette	Resch wird von TH Geyer geliefert
PCR-Pipettenspitzen	peqGOLD SafeGuard™ Filter Tips von peqlab
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, D
Polypropylenröhrchen	Greiner bio-one
QIAshredder™	Qiagen
RNeasy Mini kit	Qiagen
Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zellkulturflaschen	Nunc, Roskilde, DK
12 Well Platten	Greiner, Nürtingen, D
24 Well Platten	Greiner, Nürtingen, D
96 Well Platten	Greiner, Nürtingen, D

### Chemikalien, Lösungen, Kits

Agarose	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
ALP-Kit (DALP 250)	QuantiChrom™, BioAssay Kit, CA, USA
β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
Bovine Serum Albumin	Merck KGaA, Darmstadt, D
Bromphenol blau	Merck KGaA, Darmstadt, D
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, D
DAPI	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
ddH <sub>2</sub> O	Millipore GmbH
Dexamethason	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
DMEM®	Invitrogen™, Grand Island, N.Y., USA
DMSO	Fluka
dNTP	Qiagen
Epitope specific rabbit	
Osteopontin	Dianova GmbH
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
FITC	Dianova GmbH
FKS	PAA
FKS für Stammzellen	Stemcell
GelRed	Biotrend
Goat anti-mouse IgG FITC	Dianova GmbH
Goat anti rabbit IgG Texas	Dianova GmbH
HCl	Merck KGaA, Darmstadt, D
Hellmanex™	Hellma GmbH & Co. KG, Mühlheim, D
HUCPV	Diakoniekrankenhaus Elim, Hamburg
L-Ascorbinsäure 2 Phosphat	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
MEM Alpha Medium	Invitrogen
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, D

Monoclonal anti-Osteocalcinc- lone OC1(host: Mouse IgG1)	Dianova GmbH
MTT	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, D
Na <sub>2</sub> EDTA	Bernd Kaft GmbH
OB	Schön Klinik Hamburg Eilbek
Oligo-dT primer	Qiagen
Omniscript® RT Kit	Qiagen
Osteokalzin-ELISA Kit	eBioscience
P/S	Invitrogen™
RNase inhibitor	Qiagen
random primer	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt, D
SDS	Fluka
Tris HCL	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
Triton-X100	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Gibco, invitrogen, NY, USA
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt, D
Zellcounterflüssigkeit	Beckmann Coulter
0,5 % Triton	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
1 $\alpha$ ,25 Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub>	Fluka
14,3 M $\beta$ -ME	Merck KGaA, Darmstadt, D
37 % Formalin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, D

### Laborgeräte und Messinstrument

Abzugshaube	Hohenloher
Analysewaage	Scaltek Instruments GmbH, Göttingen, D
Autoklaven	Gössner GVA 4.6
Brutschrank	Thermo Scientific BBD 6220, Heraeus Instruments
Elektrophorese Tank	Scie-Plas HU10 Mini Plus
Fluoreszenz Mikroskop	Nikon Eclipse Ti
Isopropanolbox	Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container Cat.- No.5100-0001
Kalibrator	BioAssay Systems
Kryobehälter	MVE Inc. Bloomington, USA
Lichtmikroskop	Axiovert 25, Carl Zeiss AG, Zeiss AG, Jena, D
Mikroliterpipetten	Eppendorf AG, Hamburg, D
Mikrozentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5415C
Millipore Milli-Q	biocel

---

RT-PCR	realtime: BioRad CFX96;
RT	Eppendorf Mastercycler personal
Schüttelgerät für Mikrotiterplatten	Eppendorf Thermomixer comfort
Sicherheitswerkbank Kl.2	Heraeus instruments GmbH, Osterode, D
Spektrophotometer	Sunrise, Tecan Trading AG, CH
SsoFast EvaGreen Supermix	BioRad
Trockenschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex RK 100H, Mörfelden-W., D
UV-Transilluminator	Fisher Bioblock Scientific ECX-20-M
Vakuumpumpe	KNF Neuberger N145.1.2 AN.18
Vortex schüttelgerät	Scientific Industries Vortex-Genie 2
Waage	sartorius (LA230S)
Wasseraufbereitungssystem	Millipore GmbH
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Zellzähler	Particle count & analyzer Z2, Coulter™
Zentrifuge	Laborfuge 400R, Heraeus instruments, D

## Verwendete Lösungen

### Herstellung von PBS

Um 1 Liter 1 x PBS herstellen zu können werden 8.00 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.78 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2 H<sub>2</sub>O und 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 800 mL ddH<sub>2</sub>O gelöst und auf einen pH Wert 7.4 entweder mit HCl oder NaOH eingestellt. Anschließend wird destilliertes Wasser bis zur Grenze 1 Liter hinzugegeben und in dem Autoklaven für 20 Minuten bei 121 °C und 2 bar sterilisiert.

### Herstellung von MTT-Lösung

Es wird 250 mg MTT in 50 mL PBS gelöst.

### Herstellung von SDS-Lysis-Puffer

Es wird 50 g SDS in 500 mL HCL (0,01 M) gelöst.

### Dexamethason (100 nM)

Es wird 0,392 mg in 10 mL aqua destilliertem Wasser gelöst

### L-Ascorbinsäure 2-Phosphat (5 mM)

Es wird 1,281 g in 10 mL aqua destilliertem Wasser gelöst

### β-Glycerolphosphat (10 mM)

Es wird 2,16 g in 10 mL aqua destilliertem Wasser gelöst

### 1α,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>(10<sup>-8</sup> M)

Es wird 0,417 mg in 10 mL Isopropanol gelöst

### ALP Stocklösung:

Assay Buffer: 200 µL \* (150/207) \* X

Mg Acetate: 5 µL \* (150/207) \* X

pNPP: 2 µL \* (150/207) \* X

Das X steht für die Anzahl der Proben die untersucht werden sollen.

### TBS-Lösung

20 mM Tris/HCl pH 7.6, 137 mM NaCl und 0.1 % Tween 20 benötigt.

### 6X Loading Buffer (DNA-RNA)

Es wird 40 % Saccharose [w/v] + 0.25 % Bromphenol blau [w/v] in ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### 10X TAE

Es wird 48.4 g Tris in 500 mL dH<sub>2</sub>O gelöst. 100 mL 0.1 M Na<sub>2</sub>EDTA (pH8) und 11.42 mL Eisessig werden hinzu gegeben. Das Volumen muss jetzt auf 1 Liter mit dH<sub>2</sub>O justiert werden.

### Blockierungslösung

1 % Triton-X und 2 % Bovine Serum Albumin (BSA) werden in PBS gelöst.

**Extraktionslösung**

0,5 % Triton-X in PBS gelöst.