

# **Mikrofunktionalisierte FG-Implantate**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Sarah Strauß

geboren am 05.05.1982 in Essen

2013

**Referent: Prof. Dr. med. P.M. Vogt**

**Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. E. Ungewickell**

**Tag der Promotion: 08.04.2013**

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abstract	3
Zusammenfassung	4
Abkürzungsverzeichnis	5
Einleitung	7
<i>Hybridimplantate als Alternative zum Tissue Engineering und Vollimplantaten</i>	7
<i>Stammzellen aus dem Fettgewebe</i>	8
<i>Nitinol als innovatives Material für Knochenimplantate</i>	10
<i>Stand der Technik bei der Fertigung von NiTi-Bauteilen</i>	12
<i>Innovative Fertigungsverfahren</i>	14
<i>Oberflächenmodifikationen zur verbesserten Osteointegration</i>	15
<i>Implantatdesign</i>	17
<i>Zielsetzung</i>	19
Fachartikel: Induction of osteogenic differentiation of adipose derived stem cells by micro-structured Nitinol actuator-mediated mechanical stress	20
Fachartikel: Adhesion, vitality and osteogenic differentiation capacity of adipose derived stem cells seeded on Nitinol nanoparticle coatings.	34
Diskussion	45
<i>SLM-NiTi und NiTi-Nanopartikel haben keine toxischen Effekte auf ASCs und murine Makrophagen</i>	45
<i>Eignung des verwendeten unbeschichteten NiTi-Feinblechs als Kontrollmaterial</i>	46
<i>ASCs adhären und proliferieren auf NiTi und NiTi-Nanopartikelbeschichtungen</i>	47
<i>Erfolgreiche Besiedlung 3-dimensionaler SLM-Strukturen</i>	50

<i>Mechanische Induktion der osteogenen Differenzierung von ASCs</i>	50
<i>Implantatdesign</i>	53
Ausblick	55
<i>Implantat vermittelter mechanischer Stress zur osteogenen Differenzierung</i>	55
<i>In vivo Handhabung der SLM-Strukturen</i>	55
<i>Veränderungen durch zyklische Belastungen in vitro</i>	56
<i>Allergisches Potenzial</i>	56
<i>Ausschluss einer Biokorrosion von NiTi</i>	57
<i>Rechtliche Rahmenbedingungen</i>	57
Fazit	59
Literatur	60
Erklärung zur Dissertation	66
Curriculum Vitae	67
Publikationen	68
Danksagung	70



## **Abstract**

Bone tissue engineering still remains a challenge while treatment with state of the art implants or autologous transplants often leads to problems. The study at hand successfully combined innovative biological and material scientific approaches to create a bone implant out of selective laser melting (SLM)-fabricated structures with nanoparticle surface modification and adipose derived stem cells (ASCs). They could be used in facial reconstructions or in load bearing defect sites of the extremities.

One of the major problems in the field of osteoimplants is the stiffness mismatch between implant material and bone tissue which induces tension and therefore can lead to inflammation and implant loosening. Nitinol (NiTi) is actually seen as a suited bone implant material as its mechanical characteristics are closer to those of bone than any other material licensed for implantation. Although there exist many studies regarding biocompatibility of NiTi, the influence of the material in form of sheets as well as SLM-fabricated structures and nanoparticles on ASCs remains unclear. In our study we focused on the compatibility of the three material forms with ASCs. Results demonstrate that ASCs tolerate NiTi in all tested forms very well and were vital even inside three-dimensional structures.

However, the mechanical benefits of NiTi alone do not solve the problems mentioned above. Beside the material, design is a striking point for successful osseointegration. Plane surfaces offer a comparatively small surface for cell adhesion without spaces for cell and vessel ingrowth. Both factors could be covered by an innovative implant design and surface modifications. Selective laser melting of NiTi powder enables fabrication of three-dimensional structures with interconnected spaces which allow ingrowth of cells and vessels. In addition to this, surface roughness could be enhanced to achieve better cell adhesion. An easy way of modification could be a coating with NiTi-nanoparticles. On the nanoparticle coatings cells showed enhanced dimensional growth. Differentiation capacity did not change on the material forms in comparison to glass and cell culture plastic.

Adipose derived stem cells (ASCs) could be seeded on the surfaces for an autologous bioactivation. These cells are able to undergo osteogenic differentiation and can be isolated easily from subcutaneous fat with low donor site morbidity. Following the hypothesis that this differentiation can be induced by application of mechanical stress another feature of NiTi might be useful as this material belongs to the group of memory shape alloys (SMAs). Induction of the one-way-effect could lead to application of mechanical stress on the seeded ASCs, inducing their osteogenic differentiation. In order to prove this, osteogenic differentiation was induced by established chemical stimulation as well as by application of mechanical stress by compression of three-dimensional structures, simulating the one-way-effect of NiTi. This was the first study demonstrating that osteogenic differentiation of ASCs can be induced by mechanical stress without further stimulation by chemical supplements.

**Keywords:** adipose derived stem cells, bone implant, Nitinol

## **Zusammenfassung**

Die in vitro Synthese von Knochen ist noch nicht ausgereift. Die Behandlung von Knochendefekten mit Implantaten ist zwar eine etablierte Methode, jedoch mit Problemen behaftet. Die vorliegende Arbeit kombinierte erfolgreich biologische und materialwissenschaftliche Ansätze zur Entwicklung eines Knochenimplantates mittels selektivem Laserschmelzens (selective laser melting, SLM), einer Oberflächenmodifikation mit Nanopartikeln und aufgesiedelten Fettstammzellen (adipose derived stem cells, ASCs). Das Implantat könnte zukünftig sowohl für die Rekonstruktion z.B. im Gesicht als auch für die Therapie lasttragender Knochendefekte eingesetzt werden.

Eines der Hauptprobleme der Knochenimplantate sind die unterschiedlichen Steifigkeiten von Knochen und Implantat, welche Spannungen erzeugen. Diese können zu Entzündungen und Lockerung des Implantates führen. Nitinol (NiTi) besitzt knochen-ähnliche mechanische Eigenschaften. Zahlreiche Studien stufen die Biokompatibilität dieser Legierung als gut ein. Über die Interaktionen von NiTi-Feinblechen, -SLM-Strukturen und -Nanopartikeln mit ASCs existieren jedoch bisher nur wenige Daten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Kompatibilität der drei Materialformen mit ASCs untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass sie von den Zellen sehr gut toleriert werden. ASCs waren zu jedem Analysezeitpunkt vital, sogar innerhalb drei-dimensionaler NiTi-Strukturen.

Die mechanischen Eigenschaften allein lösen die Implantat-Problematik nicht. Neben ihnen spielt auch das Implantat-Design eine wichtige Rolle bei der Osteointegration. Glatte Oberflächen bieten wenig Platz für Fokaladhäsionen. Des Weiteren fehlen Öffnungen für das Einwachsen von Zellen und Blutgefäßen. Beides ist jedoch für eine stabile und langfristige Integration des Implantates in den Knochen von erheblicher Bedeutung. Das SLM von NiTi-Pulver ermöglicht die Herstellung von Strukturen, die das Einwachsen von Zellen und Blutgefäßen erlauben. Die Rauigkeit der Materialoberfläche, als wichtiger Faktor für gute Zelladhäsion, kann durch eine Beschichtung mit NiTi-Nanopartikeln erhöht werden. ASCs zeigten auf dieser ein verstärktes dreidimensionales Wachstum, die osteogene Differenzierbarkeit wurde von allen drei Materialformen nicht beeinträchtigt.

Die prätransplantative Besiedlung von Implantaten mit autologen ASCs ist eine biologische Modifikationsmöglichkeit. Die Zellen können osteogen differenzieren und sind einfach aus subkutanem Fett zu isolieren. Zieht man in Betracht, dass ASCs durch mechanischen Stress zur osteogenen Differenzierung angeregt werden könnten, ließe sich eine weitere Eigenschaft von NiTi nutzen. NiTi gehört zu den Formgedächtnislegierungen (memory shape alloys, SMAs). Durch Induktion des Einweg-Effektes und daraus resultierender Kompression könnte über das Material der notwendige mechanische Stress auf die aufgesiedelten ASCs ausgeübt werden. Zum Vergleich wurden ASCs auf dem in der Literatur ausführlich beschriebenen chemischen Weg osteogen differenziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die erfolgreiche osteogene Differenzierung von ASCs durch mechanische Stimulation ohne chemische Unterstützung beschrieben.

**Schlagerworte:** adulte Fettstammzellen, Knochenimplantat, Nitinol

## Abkürzungsverzeichnis

3d	dreidimensional
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
Al	Aluminium
AMG	Arzneimittelgesetz
ASCs	Fettstammzellen (adipose derived stem cells)
BMP	bone morphogenic protein
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CT	Computertomographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	extrazelluläre Matrix
FG	Formgedächtnis
FGL	Formgedächtnislegierung
GewebeG	Gewebegesetz
h	Stunde
hCAEC	humane coronar-arterielle Endothelzellen (human coronary arterial endothelial cells)
hCASMC	humane coronar-arterielle glatte Muskelzellen (human coronary arterial smooth muscle cells)
M	Mol
m	Meter
MIM	Metallpulverspritzguss (metal injection moulding)
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm

$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{M}$	Mikromol
MSCs	mesenchymale Stammzellen (mesenchymal stem cells)
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid
Ni	Nickel
NiTi	Nitinol
nm	Nanometer
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
SLM	selektives Laserschmelzen (selective laser melting)
SMA	Formgedächtnislegierung (shape memory alloy)
T	Temperatur
t	Zeit
TFG	Transfusionsgesetz
Ti	Titan
TLR	Toll-like Rezeptor
TPG	Transplantationsgesetz
V	Vanadium

## **Einleitung**

### *Hybridimplantate als Alternative zum Tissue Engineering und Vollimplantaten*

Trotz großer Fortschritte im Bereich des Tissue Engineerings bleibt die in vitro Synthese von Knochen eine große Herausforderung. Größere Knochendefekte kritischer Größe, bei der Spontanheilung nicht mehr möglich ist bzw. zu lange dauern würde, werden zumeist mit metallischen oder keramischen Implantaten behandelt. Bei kleinen Defekten besteht zudem die Möglichkeit der Transplantation autologen Knochens. Beide Ansätze stellen jedoch nicht das Optimum der Versorgung dar. Die Entnahme autologen Knochens ist für den Patienten mit den üblichen Risiken eines operativen Eingriffs (z.B. Narkosenebenwirkungen, Infektionsgefahr) und Wundschmerz verbunden. Der Einsatz von Implantaten erfolgt routinemäßig, bei den verwendeten Materialien besteht jedoch weiterhin Optimierungsbedarf. Sowohl metallische Werkstoffe wie Edelstahl oder Titan, als auch Keramiken differieren in Bezug auf mechanische Eigenschaften wie Steifigkeit und Flexibilität erheblich von denen des Knochens (Shabalovskaya 2001). Diese Unterschiede erzeugen Spannungen an der Gewebe-Implantat-Schnittstelle. Langfristig kann es hierdurch zur Implantatlockerung kommen. Materialeigenschaften, die näher an denen des Knochens liegen, könnten dieses Problem eindämmen (Boby 1992).

Ein Ansatz zur Verbesserung der Integration von Knochenimplantaten ist die prätransplantative Besiedlung mit Zellen. Üblicherweise erfolgt diese mit mesenchymalen Stammzellen (MSCs), welche in vivo zu Osteoblasten und Osteocyten differenzieren und damit den Großteil der zellulären Knochensubstanz bilden. Bruder et al. zeigten, dass eine Besiedlung keramischer Implantate mit MSCs zu einer verbesserten Osteointegration in vivo führt (Bruder 1998). Für metallische Implantate gibt es ähnliche Forschungsansätze (Köhl 2009, Habijan 2011). MSCs können durch Anreicherung im Blut oder mittels einer Knochenmarks-Punktion gewonnen werden. Beide Verfahren sind jedoch mit erheblichen Belastungen für den Patienten verbunden. Die Knochenmarks-Punktion bringt die üblichen Risiken einer Operation (Narkosenebenwirkungen, Infektionsgefahr), so wie Wundschmerz mit sich. Die Menge der gewonnenen Zellen ist mit wenigen hundert pro Milliliter so gering (Fraser 2006), dass sie vor der Besiedlung eines Implantats in vitro vermehrt werden müssen. Die Anreicherung im Blut erfolgt durch Einnahme von Wachstumsfaktoren. Im Verlauf der Behandlung können Fieberschübe und andere

Nebenwirkungen auftreten. Zudem ist bisher unklar, welche systemischen Wirkungen die verabreichten Wachstumsfaktoren entwickeln.

### *Stammzellen aus dem Fettgewebe*

Als Alternative zu MSCs können zur Besiedlung von Knochenimplantaten adulte Stammzellen aus dem Fettgewebe (adipose-derived stem cells, ASCs) verwendet werden. Der Aufwand zur Gewinnung von ASCs ist im Vergleich zu MSCs geringer. Einerseits ist Fettgewebe für den Arzt leichter zugänglich, andererseits ist die ASC-Dichte im Fettgewebe höher als die entsprechende von MSCs in Knochenmark oder Blut. ASCs können durch Fettabsaugung oder Biopsierung entnommen und bei Bedarf in vitro vermehrt werden. 1g Fettgewebe liefert etwa  $5 \times 10^3$  ASCs, dies entspricht dem 500fachen an MSCs, die aus 1g Knochenmark gewonnen werden können (Kuhbier 2010). Ähnlich den MSCs sind diese Zellen in der Lage osteogen zu differenzieren (Zuk 2002, Wagner 2005). Die Differenzierung kann in vitro rein chemisch oder besser chemisch mit zusätzlicher mechanischer Stimulation erfolgen. Bei chemischer Induktion der Differenzierung werden dem Zellkulturmedium zum Beispiel Glycerol-2-phosphat und Dexamethason (Zuk 2002) oder BMP-2 zugesetzt. Eine weitere Möglichkeit ist die genetische Manipulation, mit der nach Transduktion BMP-2 in den Zellen exprimiert werden kann (Dragoo 2003). Eine mechanisch unterstützte Induktion wurde erfolgreich in verschiedenen Bioreaktoren unter zusätzlicher chemischer Stimulation durchgeführt (Abb.1). Die mechanische Stimulation kann durch verschiedene Techniken vermittelt werden. So können durch einen konstanten oder pulsierenden Fluss von Medium über die Zellen Scherkräfte erzeugt oder die Zellen werden einer zyklischen Zugbelastung ausgesetzt werden (Bodle 2011, Mischen 2008, Tjabringa 2006, van Griensven 2009, Weyand 2012). Darüber hinaus gibt es Ansätze, die die Möglichkeit der elektrischen Stimulation untersuchen (Bodle 2011).

Verschiedene in vivo Studien an Nagern stützen die These, dass ASCs die Heilung von Knochendefekten kritischer Größe (bei denen also keine Spontanheilung möglich ist) positiv beeinflussen (Bodle 2011). Cowan et al. therapierten innerhalb von 12 Wochen erfolgreich Defekte kritischer Größe im Schädeldach von Mäusen, in dem sie ASCs auf einem Polylactid-Scaffold ansiedelten (Cowan 2005). In Ratten setzten

sowohl Conjero et al. als auch Yoon et al. ASCs erfolgreich zur Therapie kritischer Defekte ein. Während die Studie von Conjero et al. am Gaumendach durchgeführt wurde (Conjero 2006), studierten Yoon et al. wie Cowan den Einsatz von ASCs am Schädeldach (Yoon 2007). In beiden Studien erfolgte die Transplantation der ASCs durch vorhergehende Aufsiedlung der Zellen auf Scaffolds (Trägergerüste).

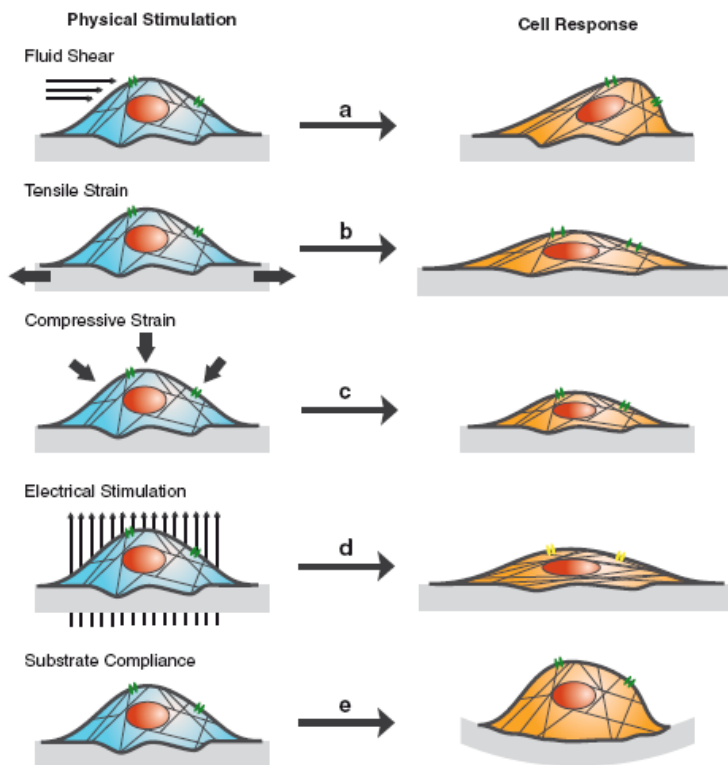


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Reaktionen von ASCs auf physikalische Stimuli (Bodde 2011)

*a Apikale Deformation der Zelle, Rezeption durch Cytoskelett, Öffnung dehnungsaktivierter Ionenkanäle*

*b Basale Dehnung der Zelle, Rezeption durch Fokaladhäsionen, Öffnung dehnungsaktivierter Ionenkanäle*

*c Apikale Stauchung, Verdichtung von Cytoplasma und Cytoskelett*

*d Ausrichtung der Zelle und ihres Cytoskeletts senkrecht zum elektrischen Feld*

*e Substratbeschaffenheit beeinflusst Ausbildung von Fokaladhäsionen, Ausbreitungsmöglichkeiten und Zellmorphologie, Integrin-Cytoskelett vermittelte Veränderungen im Zellverhalten*

In einer Fallstudie beschrieben Lendeckel et al. als erste die erfolgreiche Behandlung eines Defekts am humanen Schädelknochen mit ASCs (Lendeckel 2004). Hier erfolgte eine direkte Behandlung der Defektstelle mit ASCs in Kombination mit Knochenzement und Fibrin. Ob die eingesetzten Zellen osteogen differenzierten oder als Cytokinlieferanten für MSCs aus der Umgebung dienten, blieb in dieser Studie ungeklärt.

Alle bisher durchgeführten in vivo Studien weisen eine Gemeinsamkeit auf: Die Zellen wurden aufgesiedelt auf ein dauerhaftes Implantat oder einen resorbierbaren Träger in die Defektstelle am Knochen transplantiert. Die Bindung der Zellen an eine Oberfläche erleichtert zum einen die Handhabung, zum anderen wird durch das Trägermaterial der Defekt geschlossen.

#### *Nitinol als innovatives Material für Knochenimplantate*

In den letzten Jahren rückte eine metallische Legierung in den Fokus der Implantatforschung: Nitinol (NiTi). NiTi gehört zu der Gruppe der Formgedächtnis-Legierungen (FGL). Diese Legierungen zeichnen sich durch ein pseudoelastisches Verhalten („Superelastizität“) und den namensgebenden Formgedächtniseffekt aus.

Unter Elastizität versteht man die reversible Verformung (elastische Dehnung) eines Materials, bedingt durch das „Auseinanderrücken“ der Atome im Gitter. Pseudoelastizität (Abb. 2) bezeichnet dagegen eine reversible Verformung (bei NiTi eine elastische Dehnung bis ca. max. 8%), bedingt durch eine belastungsinduzierte Phasenumwandlung (z.B. eine Scherung im Gitter). Im unbelasteten Zustand liegt das Kristallgitter des Materials in der Hochtemperaturphase (Austenit) vor. Durch Belastung entsteht bei gleichbleibender Temperatur ein martensitisches Gefüge (Niedertemperaturphase). Nach Entlastung wandelt das Material sein Kristallgitter zurück in ein austenitisches Gefüge. Diese Rückwandlung erfolgt bei gleichbleibender Temperatur unmittelbar nach Entlastung.

Im Gegensatz zur Pseudoelastizität (mechanischer Formgedächtniseffekt) benötigt der Einwegeffekt (thermischer Formgedächtniseffekt) extern zugeführte Energie (in Form einer Temperaturerhöhung) zur Rückkehr in die Ausgangsgestalt (austenitisches Gefüge) nach einer plastischen Verformung. Der Einfachheit halber wird an dieser



Stelle nur der Einwegeffekt betrachtet, der zukünftig mit dem hier entwickelten Implantat genutzt werden soll (Abb.3). Beim Einwegeffekt wird die eingeprägte Form nach einer plastischen Verformung durch Erwärmen wiederhergestellt. Im Ursprungszustand liegt das Kristallgitter als verzwillingter Martensit vor. Bei Verformung wird der Martensit entzwillingt. Wird nun eine ausreichende Menge Energie in Form von Wärme (oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur) zugeführt, kommt es zur Phasenumwandlung zu Austenit. Das Material kehrt damit in seine eingeprägte Form zurück.

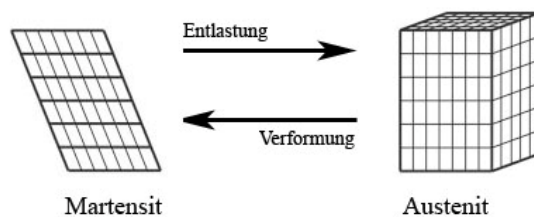


Abbildung 2 schematische Darstellung der Pseudoelastizität von NiTi

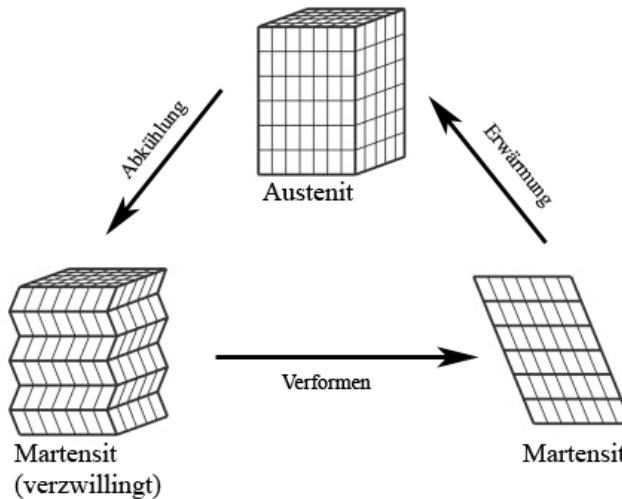


Abbildung 3 schematische Darstellung des Einwegeffekts bei NiTi

NiTi besteht aus ca. 50% Nickel und ca. 50% Titan, besitzt eine hohe Stabilität und eine Flexibilität, die näher an der von Knochen liegt als alle anderen bisher verwendeten Implantatmaterialien (Shabalovskaya 1996, Blackwood 2003, Morgan 2004). Diese Eigenschaften allein lösen jedoch die immer wieder auftretenden

Probleme mit Vollimplantaten nicht. Ein Vollimplantat bietet Zellen eine vergleichsweise glatte und damit geringe Oberfläche zur Adhäsion. Oftmals dauert es daher lange bis ein Knochenimplantat fest in den umgebenden Knochen integriert ist. Auch kann es wie beschrieben im Laufe der Zeit zu einer Lockerung des Implantates kommen. Poröse Implantate bieten eine größere spezifische Oberfläche und damit mehr Platz für die Fokaladhäsionen der Zellen. Verschiedene Studien haben die Eignung poröser NiTi-Bauteile als Osteoimplantate untersucht und diese als biokompatibel und vielversprechend eingestuft (Shabalovskaya 2001, Kujala 2003, Köhl 2009).

#### *Stand der Technik bei der Fertigung von NiTi-Bauteilen*

Erste Ansätze beschäftigten sich mit porösen NiTi-Bauteilen. Das untersuchte Material wurde von Zellen als Adhäsionsfläche angenommen (Köhl 2009, Habijan 2011). Die Herstellung erfolgte mittels Metallpulverspritzgussverfahren (metal injection moulding, MIM) in Kombination mit Spaceholder-Technik, um die gewünschten Poren im Material zu erzeugen. Zunächst wurde vorlegiertes NiTi-Pulver (also keine nachträgliche Mischung von Nickel- und Titan-Pulvern, sondern ein durch Verdüsen der entsprechenden Legierung hergestelltes Pulver) mit einem Binder (hier geben Köhl et al. nur an, dass es sich um ein Polymer aus 2 Komponenten handelt) und einem Spaceholder Material (laut Köhl 2009 NaCl, Saccharose oder Polymethylmethacrylat) in einem Heißkneteter vermischt. Durch die Erwärmung während des Knetens verflüssigte sich der Binder und machte die gesamte Masse fließfähig. Der Vorgang sorgte so für eine homogene Verteilung der einzelnen Komponenten. Das entstandene Gemisch wird als Feedstock bezeichnet. Die Masse wurde anschließend in der eigentlichen MIM-Anlage weiter erhitzt (bis 145 °C) und unter Druck (1000 bar) in eine vorgefertigte Gussform gespritzt (bei großen Bauteilen in der Regel aus Formsand und Kunstharz, bei Köhl 2009 sind allerdings keine genauen Angaben zur Zusammensetzung zu finden). Dort erstarrte die Masse bei 45 °C und konnte aus der Gussform entnommen werden. Als nächster Schritt mußte die erste Binderkomponente aus dem unfertigen Bauteil (Grünling) durch erneutes Erhitzen auf 150 °C an Luft entfernt werden. Anschließend wurde der Spaceholder herausgelöst: NaCl und Saccharose durch Erhitzen auf 80 °C in destilliertem Wasser, Polymethylmethacrylat durch Erhitzen auf < 500 °C in Argon-Atmosphäre. Als

nächster Schritt erfolgte das Entfernen der zweiten Binderkomponente durch Erhitzen in Argon-Atmosphäre auf über 500 °C für 2 Stunden. Der entstandene sog. Braunling konnte nun dem Sinterprozess zugeführt werden. Das Sintern wurde unter Vakuum bei 1250 °C für 10 Stunden durchgeführt. Eine vereinfachte Darstellung des Verfahrens zeigt Abbildung 4.

Das beschriebene Herstellungsverfahren erscheint aus verschiedenen Gründen für die zeitnahe Herstellung individueller Implantate als ungeeignet: Allein das Sinterverfahren ist mit 10 Stunden sehr zeitaufwändig. Dazu kommen die notwendigen Vorbereitungsschritte, angefangen bei dem Herstellen einer individuellen Gussform, über Herstellung des Feedstocks bis hin zur Entfernung der Binderkomponenten und des Spaceholder Materials. Die Spaceholder Technik ermöglicht zwar das Erzeugen von Poren, diese sind jedoch willkürlich verteilt (durch die Vermischung des Spaceholders mit dem Implantatmaterial). Für das Einwachsen von Zellen in Knochenimplantate sind untereinander verbundene Poren geeigneter Größe notwendig, die mit der Spaceholder Technik nicht kontrolliert erzeugt werden können (Lee 2010).

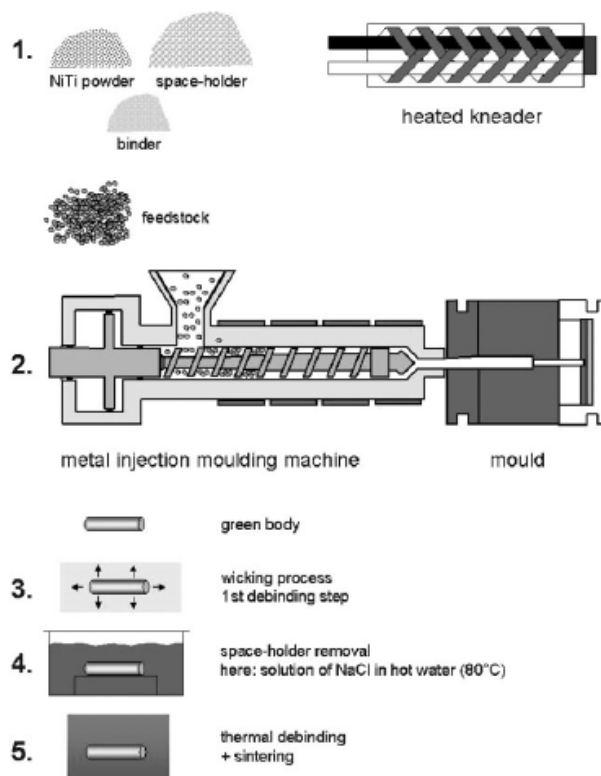
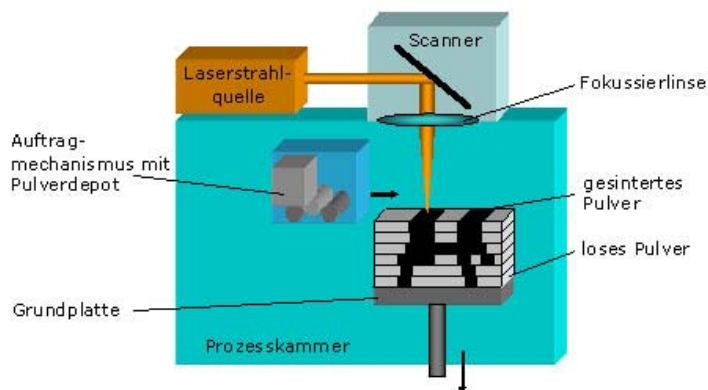


Abbildung 4 schematische Darstellung des Metallpulverspritzgussverfahrens (Köhl 2009)

## *Innovative Fertigungsverfahren*

Durch große Fortschritte im Bereich der endabmessungsnahen Bauteilerstellung bietet Rapid Prototyping eine interessante Alternative, die bereits im Tissue Engineering zur Anwendung kommt (Yeong et al. 2004). Rapid Prototyping bezeichnet Fertigungsverfahren, die in der Lage sind, aus am Computer erstellten 3d-Modellen, direkt Bauteile zu synthetisieren. In der Regel wird das Werkstück schichtweise aus Pulver (Aufschmelzen von Metall oder Kunststoffgranulat) oder Flüssigkeit (Vernetzen flüssigen Kunststoffs) durch physikalische und/oder chemische Prozesse aufgebaut. Das hier genauer betrachtete Aufschmelzen von Pulver kann durch selektives Laserschmelzen (selective laser melting, SLM) erfolgen. Beim SLM wird mittels eines Laserstrahles eine Struktur schichtweise durch Aufschmelzen eines Pulvers hergestellt (Abb. 5). Es wird jeweils eine dünne Schicht Pulver aufgetragen und an den vorgesehenen Koordinaten durch Einbringen von Energie mittels eines Lasers aufgeschmolzen. Anschließend wird eine neue Schicht Pulver aufgetragen. Die Schritte werden so oft wiederholt bis die gewünschte Struktur fertig gestellt ist.



*Abbildung 5 Schematische Darstellung des Aufbaus für das SLM-Verfahren (Dudziak 2011)*

Diese Technik kann auch zum Aufbau von NiTi-Strukturen aus vorlegiertem NiTi-Pulver verwendet werden (Bram 2002, Dudziak 2010). Das SLM erlaubt den Aufbau komplexer 3d-Strukturen mit einer minimalen Stegbreite von 50  $\mu\text{m}$  unter Erhaltung der Formgedächtniseigenschaften (Dudziak 2010) (Abb. 6). Dazu muss das eingesetzte Pulver jedoch sehr rein sein und darf keine Verunreinigungen mit anderen Elementen wie Kupfer oder ähnlichem aufweisen. Ein weiterer wichtiger Faktor ist

der Ablauf des SLM-Prozesses im Vakuum. Ist dieses nicht rein genug, kommt es zur Reaktion des NiTiS mit noch vorhandenen Sauerstoffmolekülen. Die Reaktionsprodukte werden durch das Verschmelzen der Pulverkugeln mit in das Produkt integriert und beeinflussen ebenfalls die Formgedächtniseigenschaften des Endprodukts. Im konkreten Fall bedeutet das eine Erhöhung der Phasentransformationstemperatur (siehe Abschnitt „*Nitinol als innovatives Material für Knochenimplantate*“), welche damit außerhalb des angestrebten physiologischen Bereiches um 37 °C liegt.

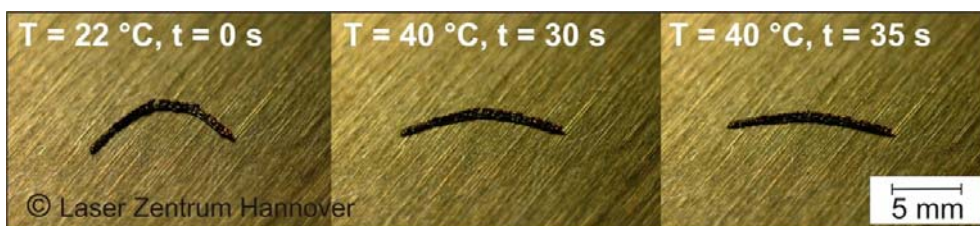


Abbildung 6 Formgedächtniseffekt einer SLM-NiTi-Struktur (Dudziak 2011)

#### *Oberflächenmodifikationen zur verbesserten Osteointegration*

Generell ist die Oberflächenrauigkeit bzw. die Nanostruktur von Knochenimplantaten ein wichtiger Faktor für die Zelladhäsion und -proliferation (Anselme 2000, Deligianni 2001, Palin 2005, Rachviandran 2009). Eine Nanostrukturierung von Oberflächen kann mit geringem Aufwand durch eine Beschichtung mit Nanopartikeln erzeugt werden. Die Herstellung von NiTi-Nanopartikeln erfolgt durch Laserstrahlablation an einem NiTi-Werkstück in Flüssigkeit (Barcikowski 2010) (Abb.7).

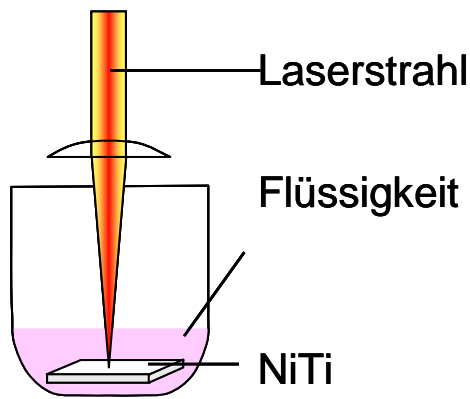


Abbildung 7 Schematische Darstellung der Nanopartikel Herstellung (Hahn 2011)

Durch die Ablation entstehen Partikel mit einem Durchmesser von ungefähr 60 nm. Das entstandene Gemisch aus Flüssigkeit und Partikeln wird als Colloid bezeichnet. In – auf Grund der Biokompatibilität bevorzugter – wässriger Lösung neigen NiTi-Nanopartikel allerdings zur Aggregation. Um sie homogen in Lösung zu halten müssen deshalb Hilfsstoffe (Additive) eingesetzt werden. Hahn et al. testeten Citrat und Cystein (jeweils mit einer Konzentration von 5 mM) als einzelne Additive. Colloide, die mit Citrat (5 mM) stabilisiert wurden zeigten bis zu einer Konzentration von 100  $\mu$ M keine toxischen Wirkungen auf Endothel- und glatte Muskelzellen arteriellen Ursprungs und wurden als biokompatibel eingestuft (Hahn 2011, Hahn 2012). Bezüglich einer Verträglichkeit der Nanopartikel mit ASCs wurde bisher nur gezeigt, dass diese Zellen auf Deckgläsern mit NiTi-Nanopartikel-Beschichtung adhäreren (Barcikowski 2010).

Zur Herstellung der Nanopartikel-Oberflächenbeschichtungen können verschiedene Verfahren eingesetzt werden. Das Einfachste ist das Auftrocknen von Nanopartikel-Colloiden. Dazu wird die gewünschte Menge Flüssigkeit auf die Oberfläche aufgetropft und an der Luft getrocknet – ein Verfahren, das für Deckgläser gut geeignet ist. Ein weiteres relativ einfaches Verfahren ist das Dip-Coating. Hier wird die zu beschichtende Oberfläche in die Colloid-Lösung eingetaucht, beim Herausziehen aus der Lösung verdunstet die Flüssigkeit und die Nanopartikel bleiben auf der Oberfläche zurück. Beide Verfahren liefern jedoch keine homogene Beschichtung. Beim Auftrocknen bilden sich kreisförmige Strukturen mit variierender Partikeldichte. Beim Dip-Coating bildet sich ein Beschichtungsgradient mit der geringsten Partikeldichte am oberen Ende der zu beschichtenden Oberfläche, welche

zuerst aus der Lösung gezogen wurde, und der höchsten Partikeldichte kurz vor der Abrisskante des letzten Lösungstropfens am unteren Ende. Dieses Phänomen kann für Analysen verschiedener Partikeldichten innerhalb einer Probe genutzt werden.

Homogene Beschichtungen auf leitenden Oberflächen können dagegen durch elektrophoretische Abscheidung (electrophoretic deposition) hergestellt werden. Dazu werden zwei Probenkörper in die Nanopartikel-Lösung eingetaucht und zwischen den Probenkörpern eine Spannung angelegt. Die Nanopartikel scheiden sich als Folge dieser Spannung an den Oberflächen der Probenkörper ab.

Die Verbindung zwischen Oberfläche und Nanopartikeln scheint sehr stabil zu sein. Es wird vermutet, dass es zu einem Verschmelzen an den Kontaktstellen kommt (persönliche Mitteilung A. Hahn 2012).

### *Implantatdesign*

Eine Kombination autologer Zellen mit einem innovativen Implantatdesign ist ein Bindeglied zwischen Tissue Engineering und dem Einsatz von Knochenimplantaten.

Beim Design eines bioaktivierten (mit Zellen besiedelten) Implantats sollten folgende Aspekte einbezogen werden:

- eine attraktive Oberfläche für Zellen um die Besiedelung zu beschleunigen
- genug Platz für das Einwachsen von Zellen um die Verbindung zwischen Implantat und Knochen zu verbessern
- eine ausreichende Porengröße um die Diffusion von O<sub>2</sub> und Nährstoffen vor einer Einsprossung neuer Gefäße und damit das Überleben der Zellen im Inneren des Implantats zu ermöglichen
- langfristig muss das Einwachsen neuer Blutgefäße möglich sein
- die Zelldifferenzierung sollte über das Implantat induziert und unterstützt werden können

Unter Berücksichtigung der genannten Aspekte erscheinen netz- bzw. käfigartige Strukturen erfolversprechend. Diese bieten zum einen den benötigten Platz für

Zellen, Versorgung durch Diffusion und das Einwachsen von Blutgefäßen und zum anderen ausreichend Stabilität, da ein Knochenimplantat gemäß seiner Funktion belastbar sein muss. ASCs eignen sich durch ihr Potenzial zur osteogenen Differenzierung und ihre gute Verfügbarkeit zur prätransplantativen Besiedlung. Basierend auf dem Wissen, dass diese Zellen unter mechanischem Stress im Bioreaktor osteogen differenzieren können (Mischen 2008, Tjabringa 2006, van Griensven 2009), wird erwartet, dass die Differenzierung auch durch Stressinduktion über das Implantat erfolgen kann.

Die Stressinduktion kann durch Nutzung des Formgedächtniseffekts von NiTi realisiert werden, bei dem, wie oben beschrieben, eine Gefügeumwandlung von Martensit in Austenit erfolgt. Durch die daraus resultierende Formveränderung wird mechanischer Stress auf die Zellen auf und in dem Implantat ausgeübt. Die für diesen Vorgang notwendige Phasenumwandlungstemperatur kann durch verschiedene Prozesse im Verlauf der Implantatherstellung beeinflusst werden (Dudziak 2010). Sie sollte in einem physiologischen Bereich liegen, so dass die Zellen bzw. später der Patient keinen Schaden nehmen. In Betracht kommen daher nur Temperaturen unter 39°C.

Eine attraktive Oberfläche für die Zellbesiedlung kann durch eine Beschichtung mit Nanopartikeln erzielt werden. Um unerwünschte chemische und/oder physikalische Reaktionen zu vermeiden ist die Verwendung identischen Materials für Träger und Nanobeschichtung sinnvoll. Im vorliegenden Fall sollte also eine SLM-NiTi-Struktur mit einer Beschichtung aus NiTi-Nanopartikeln generiert werden.



## *Zielsetzung*

Obwohl ASCs über das Potenzial zur osteogenen Differenzierung verfügen und sich damit für eine Bioaktivierung der Implantatoberfläche eignen, wurde die Kombinierbarkeit dieser Zellen mit NiTi bisher nicht untersucht.

Die vorliegende Arbeit greift diese Fragestellung auf und untersucht mögliche toxische Wirkungen von SLM-NiTi und NiTi-Nanopartikeln auf ASCs. Zellmorphologie und Zell-Oberflächen-Interaktionen auf den genannten Materialien werden analysiert. Des Weiteren wird die Möglichkeit der osteogenen Differenzierung durch Applikation mechanischen Stresses über das Implantat ohne den Einsatz chemischer Stimulanzen abgeklärt. Zum Vergleich wird zusätzlich die Differenzierung auf chemischem Wege über das Zellkulturmedium durchgeführt.

Übergeordnetes Ziel ist die Entwicklung eines mikrofunktionalisierten Formgedächtnis-Implantates (FG-Implantates) zur Therapie von Knochendefekten.

Der Fachartikel "Induction of osteogenic differentiation of adipose derived stem cells by microstructured Nitinol actuator-mediated mechanical stress" beschreibt im Folgenden die Möglichkeit der osteogenen Differenzierung von ASCs auf NiTi-Strukturen durch Applikation mechanischen Stresses. Der Erfolg der Differenzierung wurde mittels Antikörper-Markierungen molekularer Knochenmarker und histochemischer Anfärbung der Calciumablagerungen überprüft. Des Weiteren wurden mögliche toxische Wirkungen der Legierung auf die ASCs mittels live/dead und Stoffwechsellassays analysiert.

Der Fachartikel „Adhesion, vitality and osteogenic differentiation capacity of adipose derived stem cells seeded on Nitinol nanoparticle coatings.“ greift anschließend die Thematik der Nanopartikel Beschichtung des NiTi-Implantates auf. Mögliche zytotoxische Wirkungen werden ebenso untersucht wie die osteogene Differenzierbarkeit von ASCs auf Nanopartikel beschichteten Oberflächen. Die eingesetzten Untersuchungsmethoden gleichen denen des vorangestellten Fachartikels.

# Induction of Osteogenic Differentiation of Adipose Derived Stem Cells by Microstructured Nitinol Actuator-Mediated Mechanical Stress

Sarah Strauß<sup>1\*</sup>, Sonja Dudziak<sup>2</sup>, Ronny Hagemann<sup>2</sup>, Stephan Barcikowski<sup>2,3</sup>, Malte Fliess<sup>1</sup>, Meir Israelowitz<sup>4</sup>, Dietmar Kracht<sup>2</sup>, Jörn W. Kuhnert<sup>1</sup>, Christine Radtke<sup>1</sup>, Kerstin Reimers<sup>1</sup>, Peter M. Vogt<sup>1</sup>

**1** Department of Plastic-, Hand- and Reconstructive Surgery, Hannover Medical School, Hannover, Germany, **2** Laser Zentrum Hannover e.V., Hannover, Germany, **3** Technical Chemistry I and Center for Nanointegration University of Duisburg-Essen, Essen, Germany, **4** Biomimetics Technologies Inc., Toronto, Canada

## Abstract

The development of large tissue engineered bone remains a challenge in vitro, therefore the use of hybrid-implants might offer a bridge between tissue engineering and dense metal or ceramic implants. Especially the combination of the pseudoelastic implant material Nitinol (NiTi) with adipose derived stem cells (ASCs) opens new opportunities, as ASCs are able to differentiate osteogenically and therefore enhance osseointegration of implants. Due to limited knowledge about the effects of NiTi-structures manufactured by selective laser melting (SLM) on ASCs the study started with an evaluation of cytocompatibility followed by the investigation of the use of SLM-generated 3-dimensional NiTi-structures preseeded with ASCs as osteoimplant model. In this study we could demonstrate for the first time that osteogenic differentiation of ASCs can be induced by implant-mediated mechanical stimulation without support of osteogenic cell culture media. By use of an innovative implant design and synthesis via SLM-technique we achieved high rates of vital cells, proper osteogenic differentiation and mechanically loadable NiTi-scaffolds could be achieved.

**Citation:** Strauß S, Dudziak S, Hagemann R, Barcikowski S, Fliess M, et al. (2012) Induction of Osteogenic Differentiation of Adipose Derived Stem Cells by Microstructured Nitinol Actuator-Mediated Mechanical Stress. PLoS ONE 7(12): e51264. doi:10.1371/journal.pone.0051264

**Editor:** Irina Kerkis, Instituto Butantan, Brazil

**Received:** August 14, 2012; **Accepted:** October 31, 2012; **Published:** December 7, 2012

**Copyright:** © 2012 Strauß et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The German Research Foundation funded this work within the Collaborative Research Centre TransRegio 37 "Micro- and Nanosystems in Medicine – Reconstruction of biologic Functions". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** M. Israelowitz is employed by Biomimetics Technologies Inc. This company is not involved in funding of the project in hand or in any other project of the laboratory. Mr. Israelowitz did not receive payment for his help. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors.

\* E-mail: [strauss.sarah@mh-hannover.de](mailto:strauss.sarah@mh-hannover.de)

## Introduction

Nitinol (NiTi) is a promising material in the field of innovative bone implants. Its mechanical characteristics are closer to those of bone than titanium, stainless steel, ceramics or any other material on the market [1,2,3]. The stiffness mismatches between implant materials and bone tissue in known to cause implant loosening [4]. The stiffness mismatch between NiTi and bone tissue is smaller than other and reduces tension.

However, the mechanical benefits of NiTi alone do not solve general problems of dense implants like:

- long time for integration of implant in the surrounding bone tissue
- insufficient/inadequate implant integration
- need for bone cement or other filling materials
- inflammatory reactions

Different implant design and processing offers an easier way to create customized osteoimplants: An important part of an innovative design is a so called bioactivation of the implant by presettlement with autologous adipose derived stem cells (ASCs). The basic idea by that is to shorten time to osseointegration und to reduce foreign body-reactions. Bruder et al. showed that presettling of ceramic implants with mesenchymal stem cells (MSCs)

leads to faster osseointegration [5]. Habijan examined the behavior of MSCs from bone marrow aspirates on NiTi and found it to be compatible with these cells [6,7]. Compared to MSCs ASCs are easy available with minimal donor morbidity. The cells have the potential to undergo osteogenic differentiation [8,9] and may lead to faster osseointegration. Best donor sites for ASCs are the inner thigh and the lower abdomen as the highest concentrations of these cells are found there [10]. Harvesting can be done by syringe aspiration without general anesthesia which was shown to be a relatively less traumatic method [10].

As a dense metal-implant offers a comparatively small and plane surface for cell adhesion implant loosening may occur earlier than in sponge form implants where cells can grow in and which offers a bigger implant surface. Several studies already showed the suitability for the use of Nitinol as osteoimplant material with focus on porous shapes [11,12,13]. But when pores are too small cells stop ingrowth at the point of to less oxygen and/or food supply. For thicker cell layers and deeper ingrowth structures with interconnected pores are needed in vitro [14]. Porous NiTi is usually processed by techniques like injection molding. This requires the use of space holders to create pores. The generated pores and their interconnections are randomized. As a result there is no control for processing of optimal structures for cell ingrowth.

Selective Laser Melting (SLM) of NiTi-microparticles is an alternative fabrication method which allows controlled processing.

The implant evaluated in the presented study is designed as a 3-dimensional (3-d) mesh structure which offers sufficient space for cell ingrowth, oxygen and food supply by diffusion in the early phase of implant integration and in later phase space for angiogenesis.

Meshes are produced by SLM of NiTi powder [15,16]. This kind of processing allows synthesizing almost any 3-d structures designed by CAD (computer aided design) with a web thickness down to 50  $\mu\text{m}$ . Knowledge about biocompatibility of laser modified NiTi is still limited. NiTi nanoparticles generated by ultrashort laser pulses were biocompatible to ASCs [17] and only toxic to endothelial and smooth muscle cells at very high concentrations [18]. Also treatment with longer pulses (cutting with a microsecond laser) does not affect the composition of NiTi [19]. These studies used short laser pulses in order to avoid heat deposition. In contrast, SLM uses continuous wave laser with intended heat flux in order to melt the particles surfaces.

Up to now, no data are available concerning the interaction of ASCs with NiTi fabricated by SLM. The study at hand checked out the toxic potential of SLM NiTi-structures as well as cell-surface interactions and cell morphology on the material in general. Furthermore the osteogenic differentiation capacities of ASCs on SLM NiTi structures were analyzed. Induction of differentiation by cell culture medium was compared to application of mechanical stress by implant compression.

## Methods

### Processing of NiTi-structures

Powder was generated by gas atomization from NiTi bar material. The size of powder particles ranges between 25 and 45  $\mu\text{m}$ .

NiTi-meshes and complex 3-dimensional structures were assembled by selective laser melting as previously described [16,20] with web width between 100 and 150  $\mu\text{m}$  and a mesh size between 150 and 400  $\mu\text{m}$ .

For cell culture NiTi-structures were disinfected with 70% Ethanol for 2 days. Loose powder was removed by ultrasonic bath in 70% ethanol 3 $\times$ 15 min. Afterwards structures were stored in sterile distilled water at 4°C.

### ASC-isolation and Cultivation

Human ASCs were isolated from fat tissue obtained from male and female donors aged between 16 and 40 years with the written informed consent from the patients as previously described [21] following ethical standards. According to the decision of the local ethics committee of Hannover Medical School, where the study was performed, no statement was needed for the use of human primary cells in this study. The received tissue was used anonymously. Fat was separated from the dermo-epidermal layer, minced with sterile scissors followed by enzymatic digestion with 0.075% collagenase CLS (Biochrom AG, Berlin, Germany) in PBS (Biochrom) for 30 minutes at 37°C under permanent shaking. Cell containing liquid was centrifuged at 1.200 $\times$ g at room temperature for 10 minutes. Cells were cultivated in DMEM/Hams-F12 (PAA) with 10% fetal calf serum (FCS) (Biochrome), 50 U/ml penicillin/streptomycin (Biochrome), 10 ng/ml FGF and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ascorbate-2-phosphate (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. For analyses cells in passage 3 to 5 were seeded on cover glasses and Nitinol-surfaces with and without nanoparticle-coatings. Cultivation time varied according to analyses between 24 hrs, 48 hrs and 6 weeks (for osteogenic differentiation).

### Chemically Induced Osteogenic Differentiation

10<sup>5</sup> cells each were seeded on variable NiTi-meshes or cage-like structures and cultivated in 24 well-plates (CytoOne) for 5 days. Osteogenic differentiation was induced by application of dexamethasone and glycerol-2-phosphate disodium salt. Cells were cultivated with DMEM/Hams-F12 with 10% FCS, 50 U/ml penicillin/streptomycin, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ascorbate-2-phosphate, 39.3 ng/ml dexamethasone and 756  $\mu\text{g}/\text{ml}$  glycerol-2-phosphate disodium salt up to 6 weeks. Medium was changed two to three times per week.

### Mechanically Induced Osteogenic Differentiation

10<sup>5</sup> Cells were seeded on 3-dimensional NiTi-structures and cultivated in 24 well-plates for 10 days. Osteogenic differentiation was induced by application of mechanical stress. Therefore three NiTi-cages were placed in Titanium clamps (Fig. 1) and exposed to compression. Compression was controlled by clamp screws, which were tightened with a torque wrench between 5 and 20 Nm. Structures with cells were cultivated with compression in 6 well-plates containing 4 ml ASC-culture medium for 6 weeks.

### RAW264.7 Cultivation

The murine macrophage cell line RAW264.7 (ATCC, Manassas, USA) was cultivated with DMEM high glucose containing 10% FCS, 50 U/ml penicillin/streptomycin and 0.1 mg/ml sodium-pyruvate (PAA) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

### Cell Viability

Cell viability was tested by live/dead assay (Invitrogen, La Jolla, USA, #L3224) and cell titer blue assay (Promega, Mannheim, Germany, #8082).

For live dead assay ASCs were seeded on NiTi-structures and cultivated for 24–48 hrs (short time analyses of undifferentiated cells) or up to 6 weeks (long term analyses of osteogenic differentiated cells). To perform the assay cells were incubated with live/dead solution at 37°C for 30 min and then immersed in PBS analyzed by fluorescence microscopy (Olympus CK40, Cell F software). Living cells were stained green by calcein, dead cells red by ethidium-homodimer-1.

Cell titer blue assay for analyses of cells metabolic activity was performed in 96 well-plates. 10000 cells were cultivated with NiTi sheets (2 $\times$ 2 mm) (Alloy M, Memory Metalle GmbH, Weil am Rhein, Germany) for 24 to 48 hrs before cell titer blue solution was added and incubated at 37°C for 4 hrs. Cells metabolize resazurine via reduction to resorufin with an emission of 590 nm. The produced fluorescence is proportional to the number of viable cells. Fluorescence was read out with Tecan GENios multi well reader (Tecan, Männedorf, Swiss). Statistical analysis (one way ANOVA, followed by Dunnetts post hoc test) was performed with Graph Pad Prism Software.

### Microsections

As NiTi specimens are too hard for paraffine or cryo cross-sections, diamond cuts in acrylate had to be performed. For microsections 10000 cells were seeded on NiTi-structures and cultivated from 24 hrs up to 6 weeks with ASC-culture medium or osteogenic medium. Specimens were fixed in 3.7% formaline (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) and embedded in Technovit 7200 (Kulzer, Werheim, Germany) as specified by the manufacturer: dehydration with ascending set of ethanol (30, 50, 70, 90, 95, 100%) for 3 hrs each, infiltration with ascending set of technovit 7200/ethanol (30, 50, 70, 100%) for one day each. Infiltrated specimens were embedded in technovit 7200, polymer-



**Figure 1. Titanium clamp for mechanical induction of osteogenic differentiation.**  
doi:10.1371/journal.pone.0051264.g001

ization was started by white light in a vacuum (Histolux-Lichtbad, Hereaus, Wehrheim, Germany). Microsections of 30–50  $\mu\text{m}$  thickness were stained with 0.5% methyleneblue for 30 min or haemalaun for 4 hrs and eosin for 50 min, then rinsed with distilled water, followed by washing with 80% and 96% ethanol. As last step samples were air dried and mounted with Technovit 7200.

### Immunofluorescence

Immunofluorescence was performed with ASCs seeded on NiTi-surfaces and incubated for 48 hrs up to 6 weeks and then fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min, blocked and permeabilized for 3 $\times$ 5 min with PBS containing 0.1% TritonX-100 and 1% BSA. Primary antibodies (table 1) were incubated for 1 h at room temperature in a wet chamber. The samples were washed with PBS containing 0.1% TritonX-100 and 0.1% BSA. Secondary antibodies (table 1) were incubated for 30 min at room temperature in a wet chamber. Samples were washed several times with PBS. Nucleic staining was done with DAPI supplemented mounting medium (Vectorshield #h-1200). Samples were analyzed by fluorescence microscopy (Zeiss Axiovert 200 M; Olympus SZX16, CellF).

**Table 1. List of antibodies.**

Antibody	Dilution	Manufacturer	product ID
bone morphogenic protein-2	1:200	Abcam	ab14933
bone morphogenic protein-6	1:200	R&D Systems	BAF507
bone alkaline phosphatase	1:500	abcam	ab108337, ab17272
osteocalcin	1:500	Abcam	ab13420
osteopontin	1:1000	Abcam	ab8448
sparc	1:1000	Abcam	ab14174
fibronectine	1:200	Sigma	
collagen type I	1:500	Abcam	ab292
collagen type I	1:100	Chemicon	AB755P
Alexa Fluor 488	1:1000	Invitrogen	A21200
Alexa Fluor 488	1:1000	Invitrogen	A11008
Alexa Fluor 546	1:4000	Invitrogen	A10040
Alexa Fluor 546	1:4000	Invitrogen	A10036

doi:10.1371/journal.pone.0051264.t001

## Alizarin Red Staining

Calcium inclusions in cells, which are characteristics of bony tissue, were detected by alizarin red staining. ASCs were seeded on NiTi-structures and differentiated osteogenic (chemically or mechanically) for 6 weeks. Samples were fixed with 3.7% formalin. Staining was performed following this procedure: rinse with tap water for 1 h, wash with 0.1 M boric acid (pH 4), incubated for 1 h in alizarin red solution (0.5%, pH 4), rinse with boric acid, rinse with distilled water, wash with 95% ethanol, air dry. Calcium inclusions are stained red. Samples were analyzed by reflected-light microscopy (Olympus SZX16, Cell F) and digital microscopy (VK-9700 and VHX, both Keyence with VK- and VHX-Analyser Software).

## Scanning Electron Microscopy

Cells were seeded on NiTi-structures and cultured for 24 hrs and up to 6 weeks for osteogenic differentiation. Samples were then fixed in 0.2 M Na-cacodylate buffer (pH 7.4) with 2.5% glutaraldehyde for 24 hrs. Samples were incubated in 30, 50, 70, 90 and 100% acetone for 3×10 min. Critical point drying was performed with acetone/CO<sub>2</sub> in CPD 030 system (Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Samples were sputtered with gold (Sem Coating System, Polarion). Scanning electron microscopy was done with a SEM 505 (Philips). Pictures were taken with SEM-Software by Preiss and Gebert [22].

## Results

### Structure Design

We started our analysis by designing differently structured SLM NiTi devices of NiTi powder. Rationale behind the design was to create an optimized scaffold for ASC attachment and long-term growth. Basic investigation were performed with an unstructured NiTi slide of 2.5 mm width and 10 mm length without any pores or other surface structures (Fig. 2A and B) beside the roughness created by the laser melting process (Fig. 2C). ASCs have been described to prefer attachment to porous materials so meshes were processed in two different designs. In the first we created regular spaces (Fig. 2D and E) whereas in the second a screening of optimized gap width was performed (Fig. 2F). In three-dimensional cages the determined gap width with the best growth behavior of cells (Fig. 2F) were combined with an inner stacked mesh composition (Fig. 2G) and outer strength support (Fig. 2H). Here, a sufficient interconnection of pores (Fig. 2I) combined with mechanical stability could be achieved and such enough space for cell ingrowth, metabolic exchange and angiogenesis [14].

### SLM-generated NiTi is not Toxic to Cells

General cytocompatibility of NiTi was confirmed by viability tests with cell titer blue assay, using macrophages and ASCs. In case NiTi exerts an influence on the cells measured activity will be lowered as cells are no longer able to metabolize the contents of testing solution. Higher metabolic activity of macrophages can be a hint for macrophage activation and that there is an immune reaction to NiTi.

24 or 48 hrs ASCs grown under standard cell culture condition showed no significant differences in metabolic activity compared to cells grown on NiTi sheets excluding any harmful influence of the material itself. 10% DMSO, which is toxic to cells, served as toxic control and showed a significant down regulation of metabolic activity as cells died (Fig. 3A). Murine macrophage cell line raw264.7 also showed no significant reaction on stimulation for 24 or 48 hrs with NiTi in cell titer blue assay. Only the 10%

DMSO control led to a significant down regulation of activity. Activation was not observed (Fig. 3B).

### Influence of SLM NiTi on ASCs

As this is the first study investigating compatibility of ASCs with SLM NiTi surfaces we started with a characterization of their vitality on SLM-NiTi. The devices were seeded with ASCs as described materials and methods and kept on them for 48 hrs in short-term culture and six weeks in long-term culture respectively. Unstructured glass surfaces were used as a positive control (Fig. 4A). Cells adhered to the NiTi slides comparable to the glass controls (Fig. 4B and C) and had a healthy spindle-shape appearance typical for ASCs. Rates of vital cells were nearly comparable to control cells settled on cover glasses with slightly more red fluorescent nuclei visible which indicates cell death (Fig. 4C). Same observations were made after long-term culture (data not shown) indicating the cytocompatibility of the SLM NiTi.

Cell attachment to the gap and web structured meshes was efficient. Cells ensheated the webs completely and grew inside the structures (Fig. 5A). Red fluorescence was observed but from this kind of analysis it was not clear whether this was a noise signal by the scaffolds or depending on cell death. Light microscopy pictures and microsections confirmed these findings (Fig. 5B–D). Cells started to extent between the webs (Fig. 5B) and grew in several ordered layers (Fig. 5C and D). In SEM analysis cells showed the expected ASC morphology and grew efficiently on the ligaments of the meshes (Fig. 6A). In a one week follow-up the cells overgrew the meshes' gaps and formed thick layers. Extracellular matrix was secreted as clearly visible by the rough surface appearance (Fig. 6B).

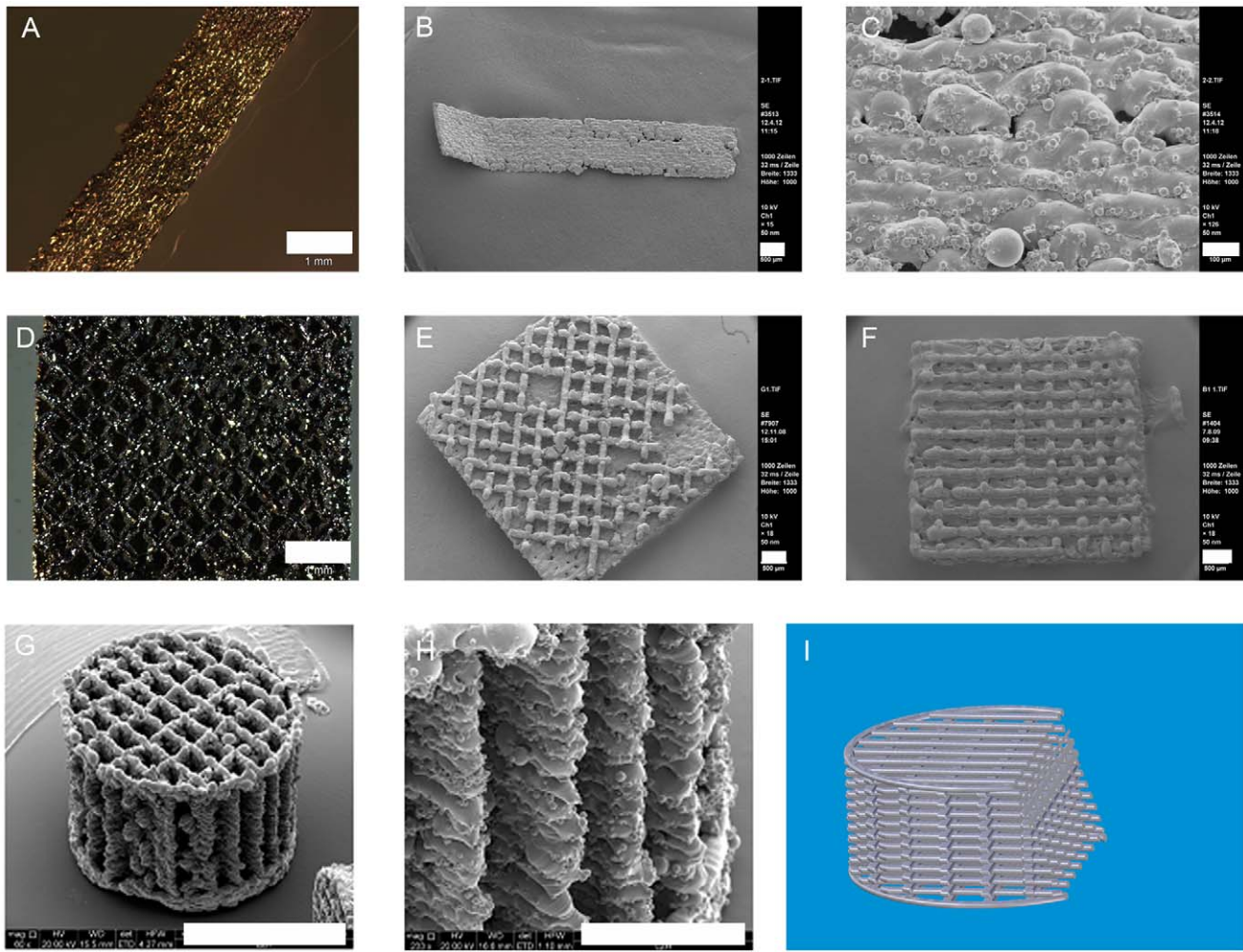
### ASCs Differentiate Osteogenic on SLM-NiTi

ASCs' osteogenic differentiation on NiTi was induced chemically or mechanically as described in material and methods. We were interested in the osteogenic differentiation capacity of ASCs grown on SLM-NiTi taking into account the influence of the spatial cell arrangements on meshes and even more importantly on the three-dimensional cages. First a well established protocol of chemical induction was used for cells grown on meshes. Meshes were then analyzed by SEM after three (Fig. 7A) and six weeks (Fig. 7B–D). After chemical induction of osteogenic differentiation, ASCs secrete a thick extracellular matrix (ECM). Especially after six weeks the original mesh structure was no longer visible (Fig. 7B–D). For differentiation between superficial deposition of ECM and complete ingrowth we additionally performed H&E stainings on acrylate microsections (Fig. 7E).

To evaluate osteogenic marker expression, meshes were completely immunostained as indicated in table 1. Negative and positive controls on cover glasses were performed according to the same protocol. All investigated markers were positive in every sample type. A selection is shown in Figure 8. In the first row, BMP-6 expression is indicated by green fluorescence in osteogenically differentiated ASCs grown on meshes, while collagen I was positively stained red (Fig. 8A). Panel B visualized BMP-2 and panel C expression of osteocalcin both in green fluorescence. In the second row, osteogenic ASCs on cover glasses showed expression of osteocalcin (Figure 8D, red fluorescence) and collagen type I (green fluorescence). Figure 8E visualizes bone alkaline phosphatase in red fluorescence and fibronectin in green.

Undifferentiated cells served as negative controls. They were found to be positive for the mesenchymal marker proteins collagen type I and fibronectin, but not for bone markers bone alkaline



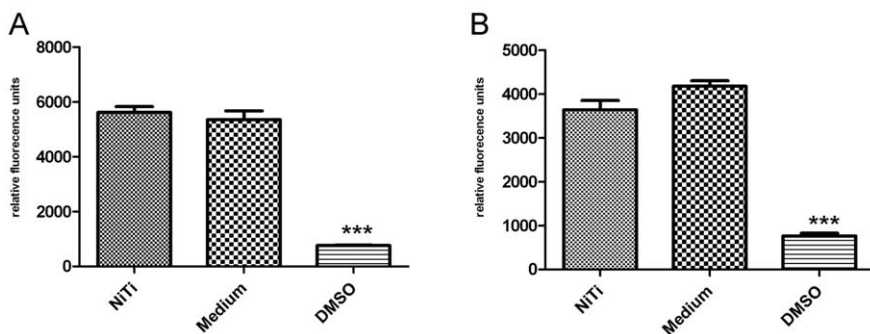


**Figure 2. SLM-NiTi-structures: flat shaped (A–C), mesh-like (D–F), cage-like with inner structure (G–I); scale bars: 1 mm (A, D), 500 μm (B, C, E, F, H) and 2 mm (G); 2I draft of inner structure, created with Solid Edge (Siemens PLM Software).**  
doi:10.1371/journal.pone.0051264.g002

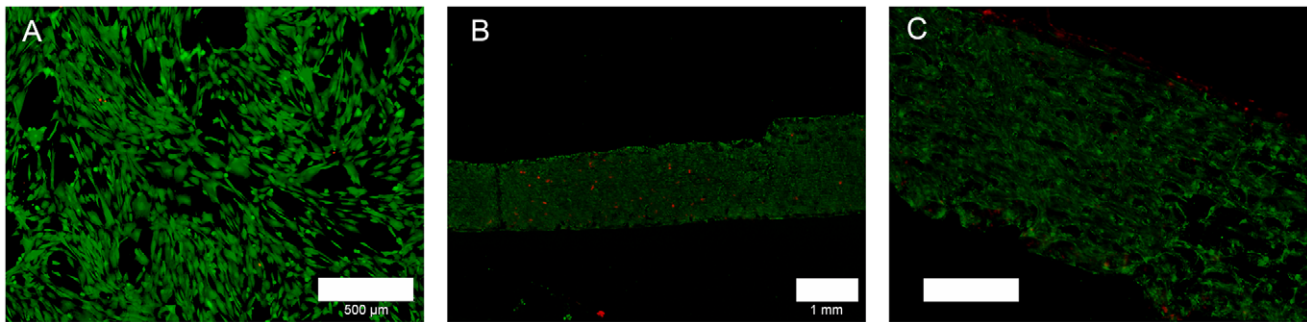
phosphatase, osteoclastin, BMP-2, BMP-6, osteopontin and sparc (data not shown).

Findings of immunofluorescence were confirmed by alizarin red stainings for calcium depositions (Fig. 9A and B): Osteogenically differentiated ASCs either grown on meshes or on cover glasses were found to be positive, whereas undifferentiated cells showed no staining.

As the previous results demonstrated ASCs could be differentiated osteogenically on SLM NiTi structures, we wanted to prove that three-dimensional cell growth in combination with mechanical force is able to induce osteogenesis without chemical manipulation. As demonstrated in figure 2, cages could be constructed with a defined inner structure. Cells were seeded on the cages for one week without applied forces to allow cell



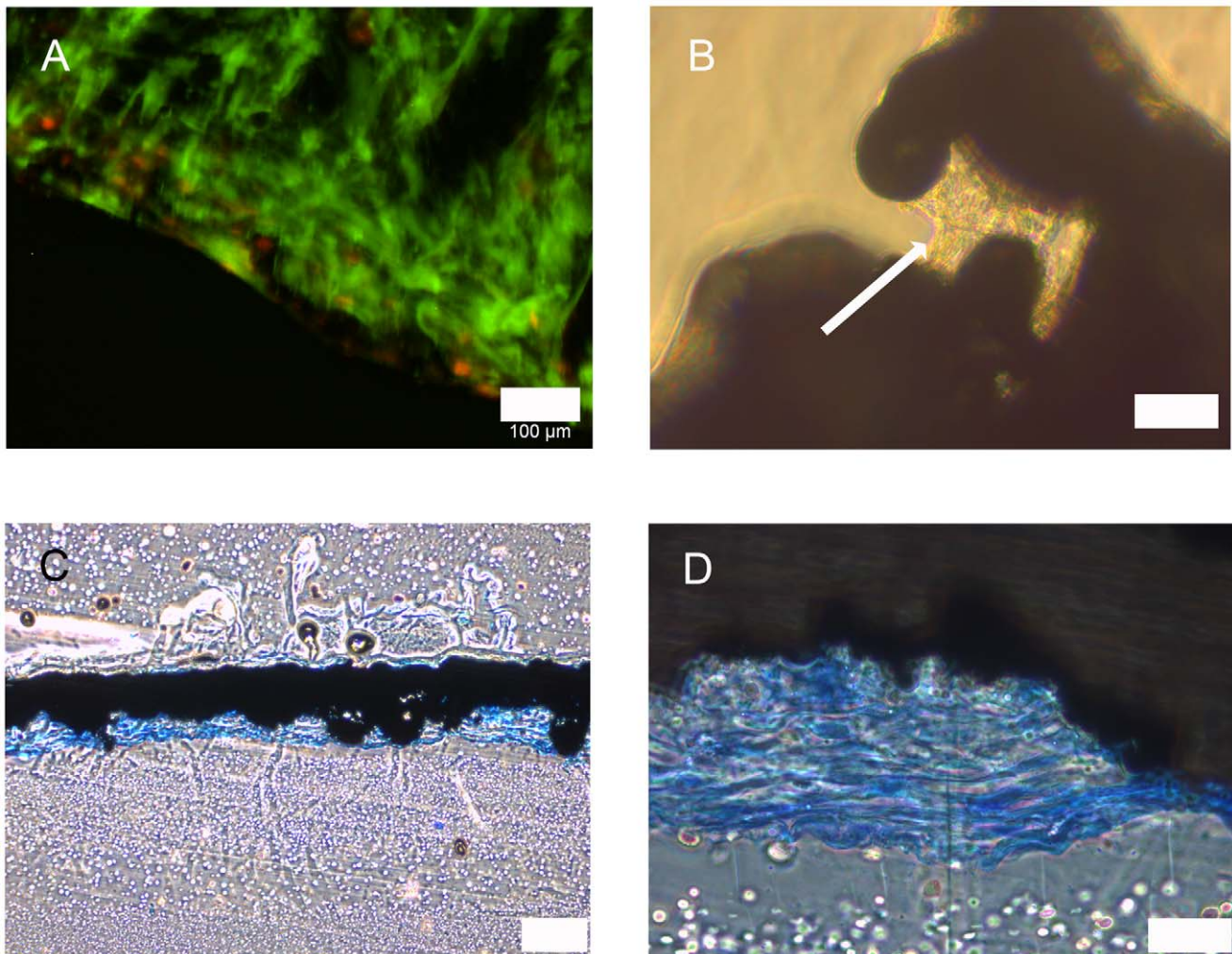
**Figure 3. Metabolic activity of ASCs (A) and murine macrophages (B) on NiTi after 48 hrs of cultivation.**  
doi:10.1371/journal.pone.0051264.g003



**Figure 4. ASCs vitality on glass (A) and SLM-NiTi (B and C); green: vital cells, red: dead cells; scale bars 500  $\mu$ m (A, C), 1 mm (B).**  
doi:10.1371/journal.pone.0051264.g004

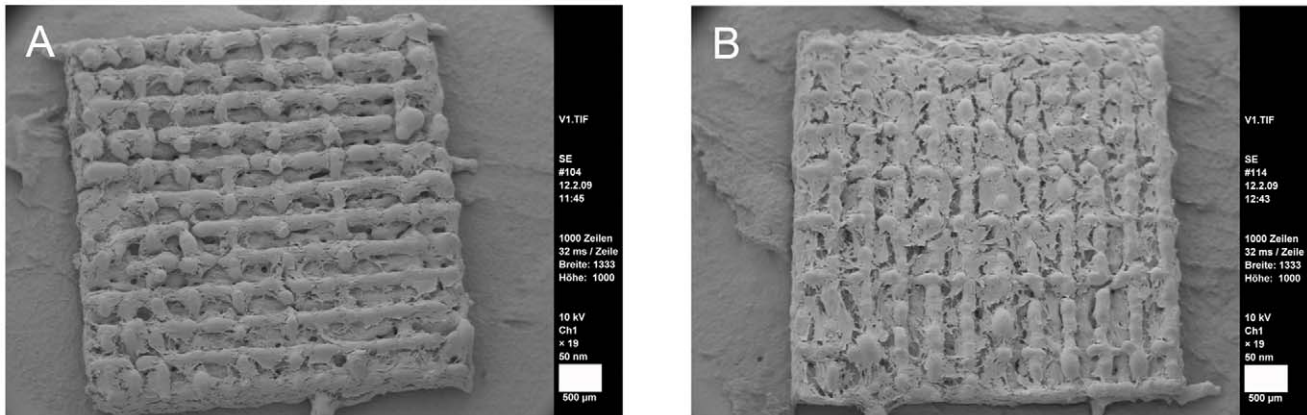
proliferation and migration into the inner parts of the cages. After that time, the cages were subjected to mechanical stress by compression of the SLM-structures. To evaluate the rates of living cells compared to controls we performed live/dead stainings. In spite of the high forces exerted continuously for six weeks, cell vitality was comparable to short time cultures on meshes and

untreated controls (Fig. 10A and B, Fig. 4A). Analyzing the spaces inside the cage like structures it was clearly visible that ASCs grew inside the structures as well as on the outside (Fig. 10A and B, live/dead assay) and C and D (light microscopy). The lively green fluorescence which could be observed in the live/dead staining additionally indicates that cells did not only grow into the inner



**Figure 5. ASCs attachment to gap and web structures.** A: live/dead staining; green: vital cells, red: dead cells; scale bar 100  $\mu$ m. B: light microscopy; ASCs spanning between gap (indicated by arrow); scale bar 50  $\mu$ m. C: acrylate microsection, methyleneblue staining; blue: ASCs; scale bar 200  $\mu$ m. D: detail of C; scale bar 50  $\mu$ m.  
doi:10.1371/journal.pone.0051264.g005





**Figure 6. SEM of ASCs on meshes.** A: after 48 hrs of cultivation; scale bar 500  $\mu\text{m}$ . B: after one week of cultivation; scale bar 500  $\mu\text{m}$ . doi:10.1371/journal.pone.0051264.g006

parts of the cages but remained vital (Figure 10A and B). This indicates that the implant design allows proper supply with  $\text{O}_2$  and nutrients.

The complete settling of cells was further confirmed by SEM pictures which gave a closer look into the cage pores (Fig. 11). Cells did not only grow inside the scaffolds but also developed a phenotype typical for osteogenic ASCs. This is visible by the flat and jagged morphology (Fig. 11C and D). Osteogenic differentiation was approved by alizarin red staining and immunofluorescence of osteogenic marker proteins. Evenly distributed calcium depositions were visualized by a homogenous red color (Fig. 12A–D) even deep inside the samples (note, the red signals inside the cages Figure legend). The staining was successful under all compression conditions even under the lowest.

Osteogenic markers could be positively detected as given in table 1. As examples osteocalcin (green fluorescence) and collagen I (red fluorescence) expression could be detected in cages subjected to a torque of 10 Nm over 6 weeks indicating that mechanical induction alone was sufficient to produce an osteogenic stimulus (Fig. 13A). Furthermore, we also verified expression of bone alkaline phosphatase (green fluorescence) and fibronectin (red fluorescence) (Fig. 13B).

When comparing the stressed specimen with untreated controls one has to realize that the cells do not close the pores of the contact surface by matrix secretion (Fig. 11A, asterisk) although the neighboring cells were vital. In contrast, the pores at the sides which were without contact to the titanium clamps were closed by cells and extracellular matrix (Fig. 11A). Further analyses are needed to evaluate to which extent the experimental set-up causes the described phenomenon.

Taken together these findings suggest the assumption that the mechanical induction of osteogenic differentiation leads to comparable results as the chemical induction.

### Calculation of Pressure Applied to SLM Structure

As there are many factors (friction, lubrication, surface roughness, material yield strength, surrounding conditions, etc.) influencing i.e. the friction coefficient [23], the calculation has to be understood as a rough estimation.

$$p_{\text{cage}} = \frac{F_{\text{press}}}{n_{\text{cages}} * A_{\text{cage\_net}}} \quad \text{with} \quad F_{\text{press}} = 2 * \pi * \eta_{\text{frict}} \frac{M_{\text{torq}}}{p_{\text{screw}}}$$

The tightening clamps were tightened by utilization of a torque wrench with a specific momentum ( $M_{\text{torq}}$ ). The resulting axial force ( $F_{\text{press}}$ ) can be calculated with the known screw pitch ( $p_{\text{screw}}$  of  $\text{M}8 \times 1 = 1 \text{ mm}$ ) and friction coefficient ( $\eta_{\text{frict}} = 0.14$  [24]).

To quantify the pressure applied to each SLM cage the resulting axial force has to be divided by the number of cages ( $n_{\text{cages}} = 3$  per clamp) and the actual contact surface between clamp and SLM cage ( $A_{\text{cage\_net}} = 3.74 \text{ mm}^2$  per structure).

For osteogenic differentiation mechanical stress was applied by tightening the clamp screws with torque between 5 and 20 Nm. Approximated by the calculations above, these torque values correspond to 392 to 1568  $\text{N/mm}^2$  pressure on each SLM cage.

## Discussion

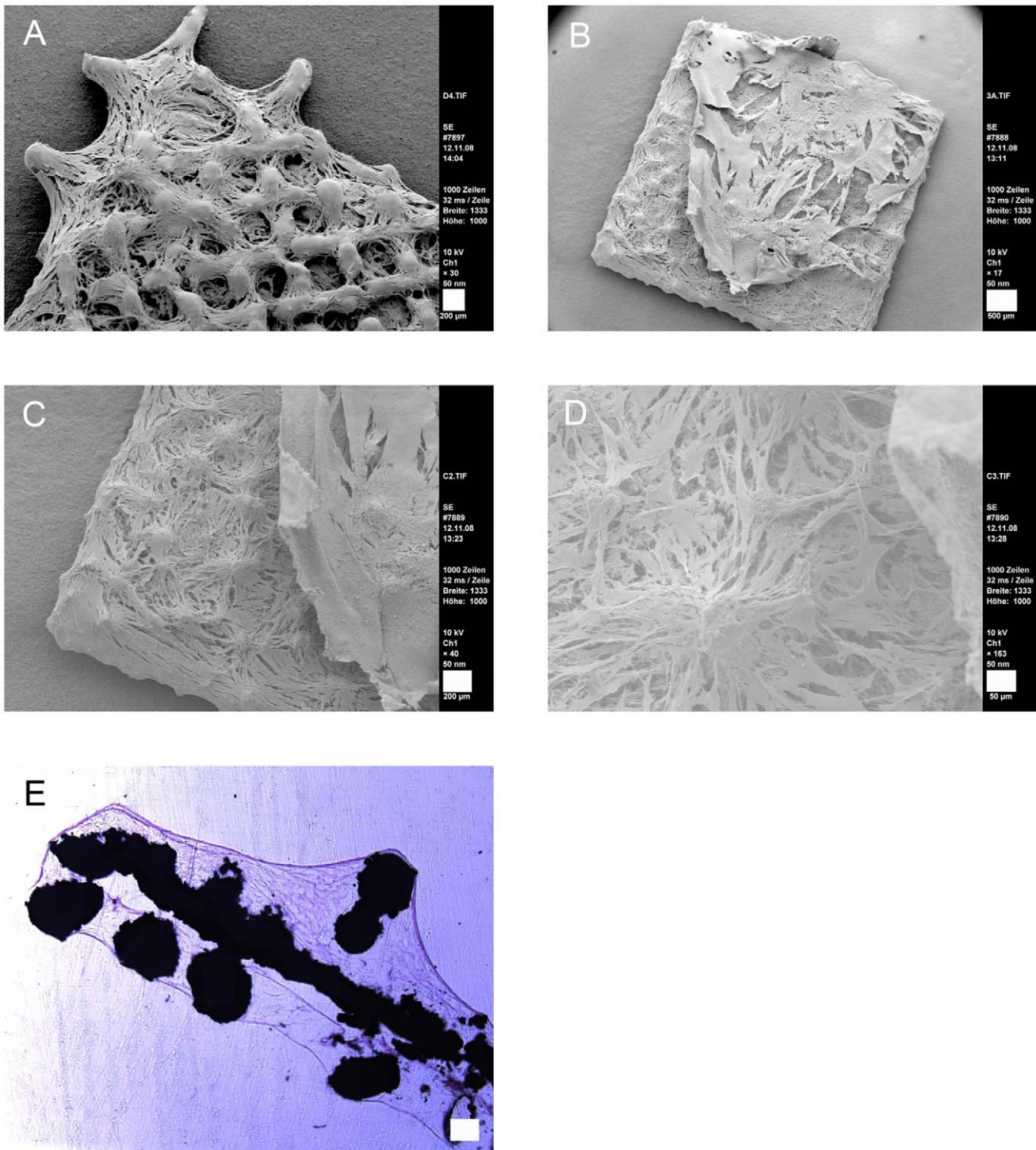
### Viability and Growth Behavior

As creation of large pieces of bone still remains a challenge in vitro, use of hybrid-implants offers a bridge between tissue engineering and dense metal or ceramic implants.

Regarding flexibility and stability Nitinol is a promising material for bone implants. The SLM-processed alloy develops no negative influence on the cells. In comparison to glass or cell culture plastics no significant difference in viability was detected. This findings correlate with studies of Habijan, who analyzed effects of dense NiTi-surfaces on MSCs subjected to cyclic loading or in static culture [7]. He observed that MSCs were able to grow unaffectedly on NiTi-surfaces generated by injection molding or rolling. Surfaces generated by SLM seem to have positive properties for cell growth. ASCs shape on flat NiTi sheets was comparable to glass whereas SLM surfaces lead to a more dimensional cell shape as roughness of this kind of surfaces is higher. Hollander et al observed similar cell morphology of human primary osteoblast like cells from the iliac crest on TiAl6V4 discs processed by SLM. The vitality was comparable to flat TiAl6V4 discs, but cell density on SLM surfaces was clearly increased [25]. We also found high rates of life cells on SLM-NiTi surfaces comparable to flat glass or NiTi and an enhanced dimensional growth. Findings of Deliginanni regarding roughness of Ti alloy discs indicate a positive influence of rough surfaces on cell attachment founded in an enhanced protein binding to the surface [26].

The study at hand and studies of Dudziak et al. evaluated a good biocompatibility of SLM-NiTi –structures regarding blood cells and ASCs [20]. NiTi was in general found to have excellent



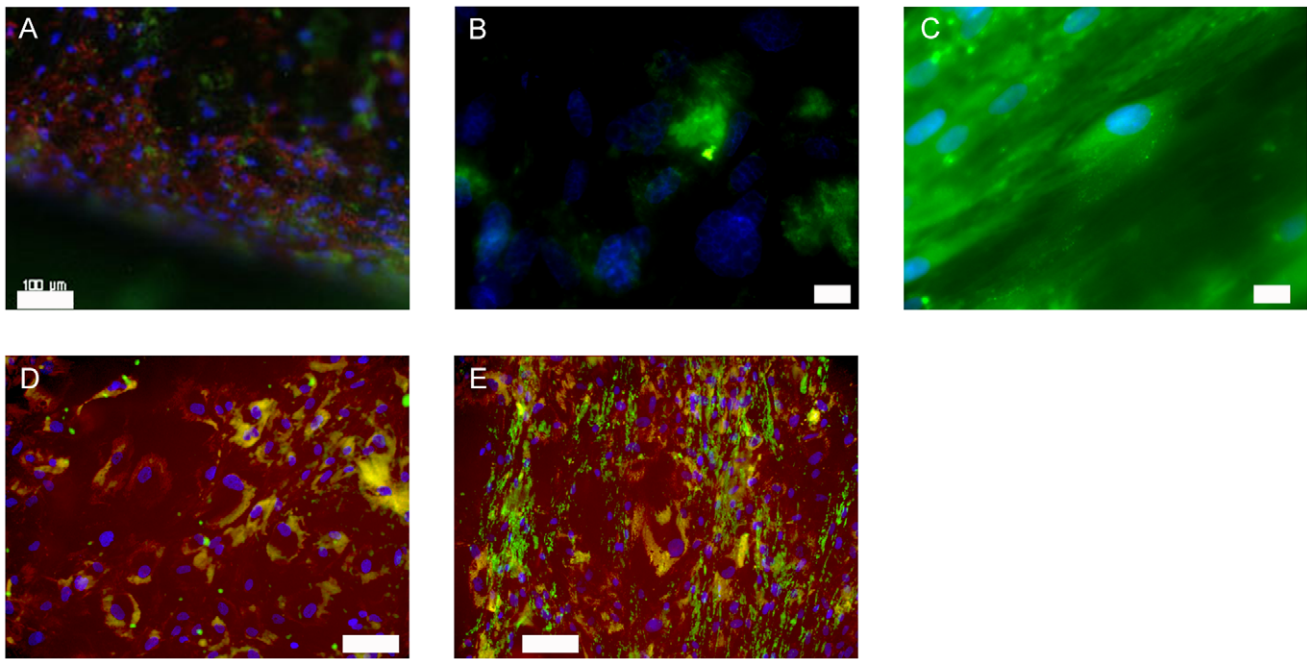


**Figure 7. Osteogenic ASCs on SLM-NiTi meshes.** A: after 3 weeks of osteogenic differentiation; scale bar 200  $\mu$ m. B–D: after six weeks of osteogenic differentiation, scale bars 500  $\mu$ m (B), 200  $\mu$ m (C), 50  $\mu$ m (D). E: microsection after six weeks of osteogenic differentiation; H&E staining; scale bar 200  $\mu$ m.

doi:10.1371/journal.pone.0051264.g007

biocompatibility characteristics [17,19,20,27]. Recent studies raise questions. Jeswani et al. discussed the use of NiTi implants for intracranial stents. Based on clinical data they came to the conclusion that the use of NiTi stents for patients with known nickel allergies has to be considered carefully [28]. An in vitro study of Habijan showed that probably only a subpopulation of

patients with nickel allergies reacts sensitive to NiTi [6]. Concerning to those data the SLM-NiTi implant needs to be evaluated further for allergic potential. Therefore testing under cyclic loading should be performed with a suitable experimental setup as it was developed by Habijan et al. [6,29]. This will give informations about possible nickel release from the implant and



**Figure 8. Expression of osteogenic markers in chemically differentiated ASCs on SLM-NiTi (A–C) and glass (D and E).** A: green: BMP-6, red collagen type I, blue: nuclei; scale bar 100  $\mu\text{m}$ . B: green: BMP-2, blue: nuclei; scale bar 10  $\mu\text{m}$ . C: green: osteocalcin, blue: nuclei; scale bar 20  $\mu\text{m}$ . D: green: collagen type I, red: osteocalcin, blue: nuclei; scale bar 80  $\mu\text{m}$ . E: green: fibronectin, red: bone alkaline phosphatase, blue: nuclei; scale bar 100  $\mu\text{m}$ .

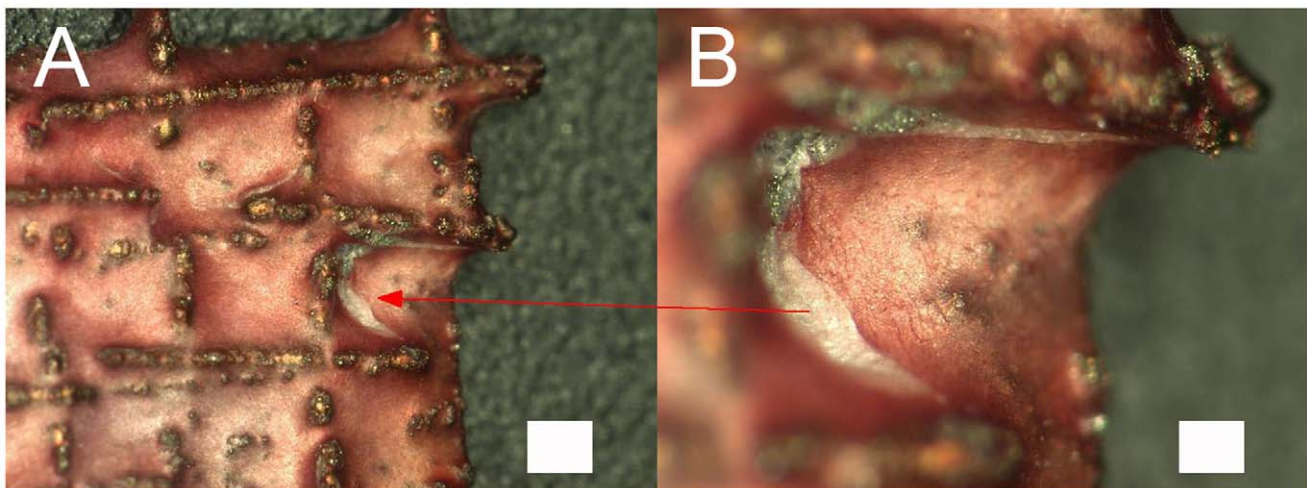
doi:10.1371/journal.pone.0051264.g008

allows studying cells reaction. Habijan tested commercially available dense NiTi cylindrical rods and found MSCs to survive on them although there was a slightly increased Nickel concentration in the cell culture media resulting from cyclic loading.

An *in vivo* model for testing the allergic potential of SLM-NiTi still remains difficult as there is only one rodent model available. Schmidt et al. generated mice expressing the human variant of toll-like receptor-4 (TLR-4), which is responsible for allergic reactions to nickel [30]. The rodent variants of TLR-4 do not mediate immune responses to nickel.

#### Osteogenic Differentiation without Chemical Stimulation

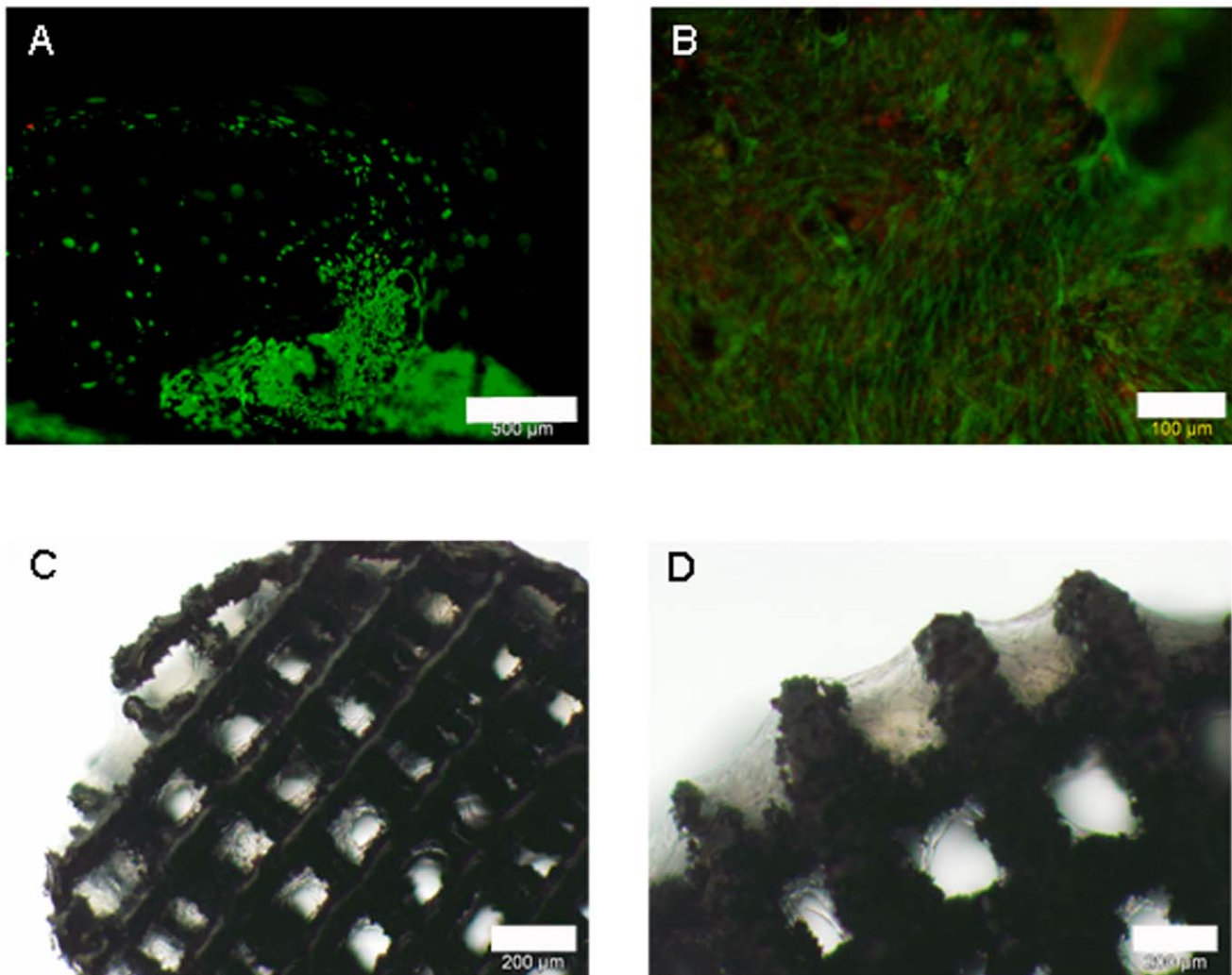
We could demonstrate for the first time that osteogenic differentiation of ASCs can be induced chemically as well as mechanically with similar results. So far mechanic differentiation of ASCs was performed within bioreactors combined with chemical stimulation, for example by supplementation with 10 nM dexamethasone 21-dihydrogen phosphate, which is a known osteogenic inducer [31]. These studies were performed on ceramics or glass [32,33,34]. The study at hand showed an independent way by application of forces via an implant without a chemical stimulation. ASCs were found to express several



**Figure 9. Alizarin red staining of chemically differentiated ASCs, 3d-digital microscopy.** A: overview; scale bar 100  $\mu\text{m}$ . B: detail; scale bar 20  $\mu\text{m}$ .

doi:10.1371/journal.pone.0051264.g009





**Figure 10. Mechanically differentiated osteogenic ASCs.** A and B: live/dead staining; green: vital cells, red: dead cells; scale bars 500  $\mu\text{m}$  (A), 100  $\mu\text{m}$  (B). C and D: light microscopy; scale bars 200  $\mu\text{m}$  (C), 300  $\mu\text{m}$  (D). doi:10.1371/journal.pone.0051264.g010

osteogenic markers when differentiation was induced mechanically. In comparison to chemical induced differentiation there were not found any visual differences in immunostainings or vitality analyses. Cells seeded on cage like structures grew inside and were still viable after 6 weeks. The inner structure of the cage-like implants seems to allow an appropriate supply with  $\text{O}_2$  and nutrients of the cells, which is confirmed by the high rates of live cells inside the structures. This is one of the striking points for long time survival of cells and in general for tissues lacking vascular supply [35]. The implant structures analyzed in this study seem to have optimal properties, according to Lee et al who showed that deep ingrowth and high rates of living cells in bone implant materials require interconnected pores with appropriate size [14]. Furthermore, they found lower viability and proliferation rates in scaffolds with random structured pores. Here the SLM technique has the crucial advantage to be able to process defined structures for cell growth directly from the computer model.

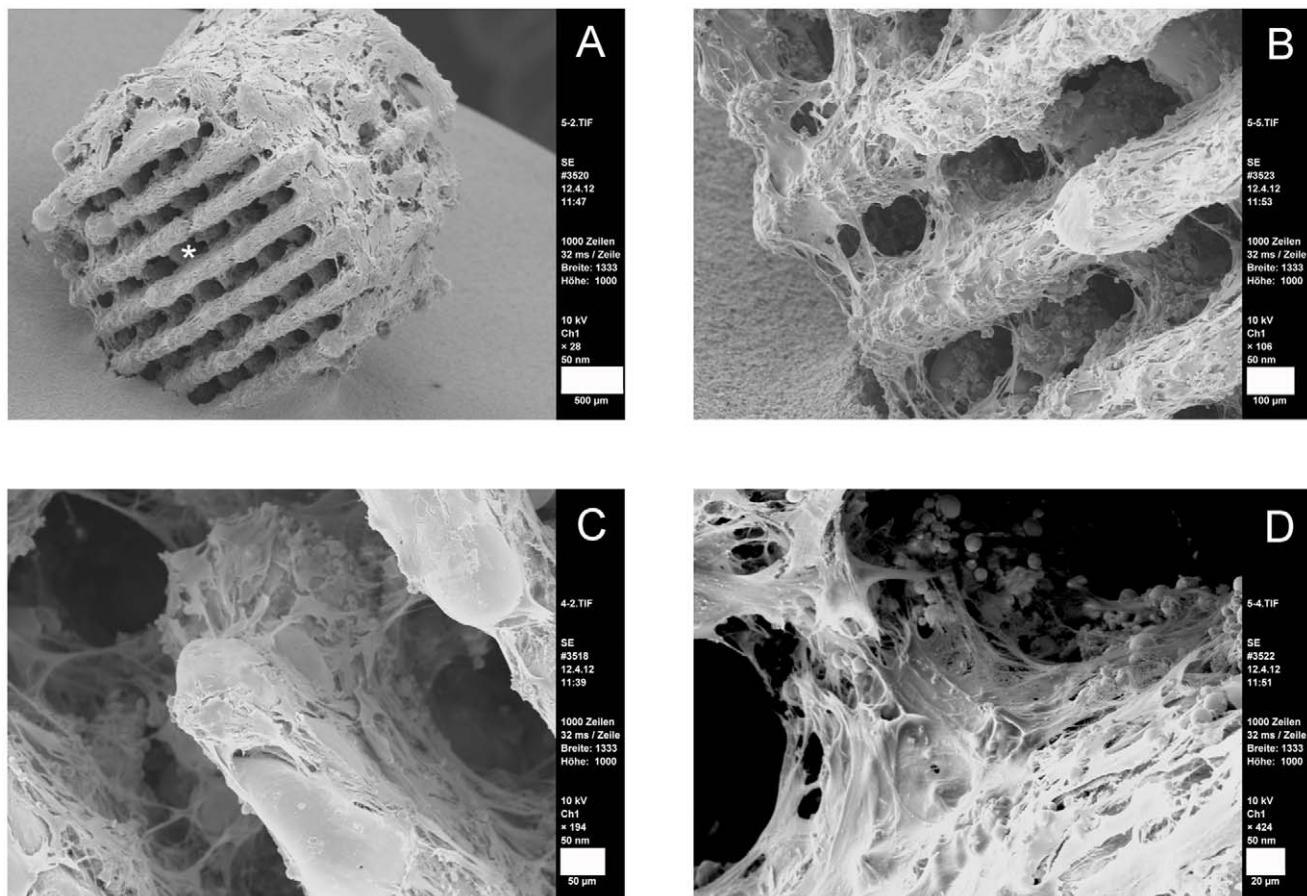
A continuative approach is the utilization of another NiTi-feature: the so called memory effect. In dental orthopedics the application of shape memory alloys is very popular, NiTi is used for example as orthodontic wire. As the study at hand demonstrated osteogenic differentiation of ASCs can be induced

by application of mechanical stress. The memory effect of NiTi might be used to induce osteogenic. Inducing the memory effect by body-temperature during implantation leads to reshaping in term of a slight compression. This compression applies mechanical stress to the attached ASCs and is thought to lead to osteogenic differentiation.

Another trigger for osteogenic differentiation of ASCs after implantation is the bony environment. In a study of Lu et al. a bone biomimetic microenvironment could induce the osteogenic differentiation of ASCs. They tested a co-culture system of ASCs and human primary osteoblasts on 3d-nanocomposite scaffolds. ASCs were found to express high amounts of osteocalcin and also osteopontin after 14 days of co-cultivation [36].

#### Further Prospects

Long time survival of our hybrid-implant in vivo depends on vascularization. The vascularization capacity of engrafted structures is one of major hurdles of tissue engineering [37]. Different strategies like use of endothelial cells or growth factors are pursued to obtain neo-vascularization of engineered tissues on scaffolds [38]. Unger et al. demonstrated that the combination of human osteoblasts and endothelial cells in vitro leads to a presettlement of



**Figure 11. SEM of mechanically differentiated ASCs.** A: overview; cells do not close the pores of the clamp-contact surface (indicated by asterisk); scale bar 500 µm. B–D: osteogenic ASCs inside the pores, scale bars 100 µm (B), 50 µm (C), 20 µm (D). doi:10.1371/journal.pone.0051264.g011

porous NiTi with a microcapillary-like network [39]. Assad et al. achieved good results with a porous NiTi bone implant without cells in sheep. Within 12 months they found vessels grown into the pores of the implant [40]. Based on those data SLM NiTi cages offer a high potential to be supplied with vessels *in vivo*. As ASCs are a rich source of VEGF [41,42] it is conceivable that there is no chemical loading of the implant needed to attract new vessels in a very short time. Based on the SEM analyses, cage-like implants should be implanted not later than 24 hrs after activation with autologous ASCs. A longer incubation results in an overgrowth of the pores by ASCs. Shorter *in vivo* culturing times or lower cell numbers are needed.

The system offers a fast way of therapy. Implant processing and cell withdrawal can be done within one day, ASCs settlement on the implant over night. So implantation can be executed the following day. This is a quite short time period for processing a complete customized implant. Implant integration might be supported by cells from surrounding bone tissue and marrow. The open structure allows the migration of cells from outside into the implant.

Due to the unavailability of NiTi-structures with an appropriate reset temperature by start of this study, the NiTi memory effect had to be simulated by external force application utilizing clamps (Fig. 1). The test system worked properly.

The low implant weight allows its application in every region of the body. It might be very useful for reconstructions in the face (Fig. 14) as well as for therapy of load bearing defects. The

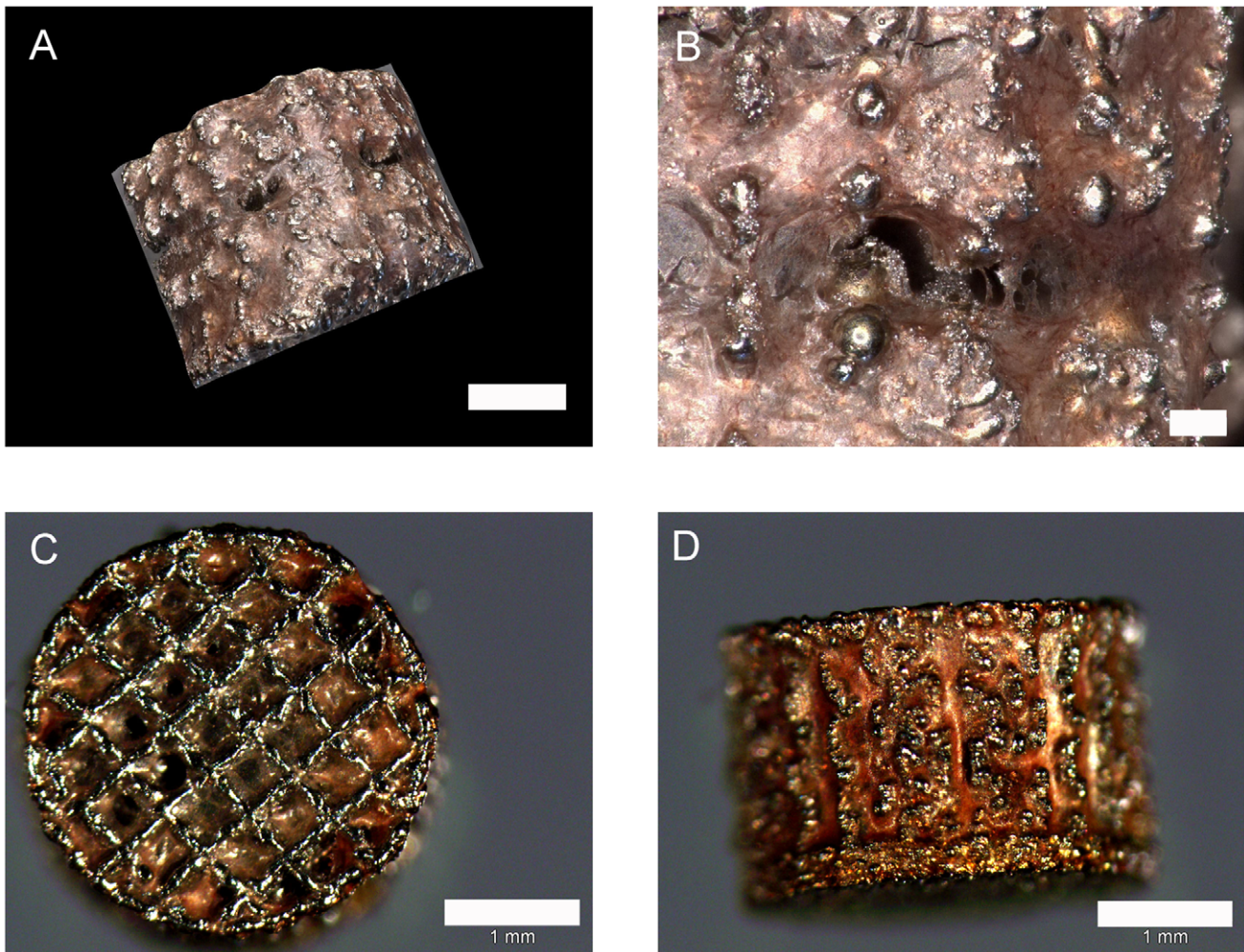
calculations of pressure revealed tolerances of more than 1568 N/mm<sup>2</sup> of each cage. Turned to Kilogramms ( $m = F/g$ ) this means a loadability of approximately 160 kg.

Although NiTi is extremely loadable, in long term disposition problems by material fatigue may occur. Several studies describe fractures of NiTi stents *in vitro* [43] and *in vivo* [44] as well as in dental instruments [45]. An elaborate discussion of fatigue and its causes in NiTi can be found in the review of Robertson et al. [46]. They postulate that fabrication, material processing and surface conditions have substantial influence on fatigue of NiTi, but in contrast to McKelvey et al. [47] Robertson et al. postulate that NiTi has no lower fracture toughness and faster crack growth than other implant materials. The discussion about fatigue of NiTi and the comparison to other approved implant materials is quite complex and controversial; nevertheless a fatigue of the implant especially in load bearing sides would be fatal. The developed SLM-generated implant has to undergo detailed investigations by experts to prevent failure after implantation.

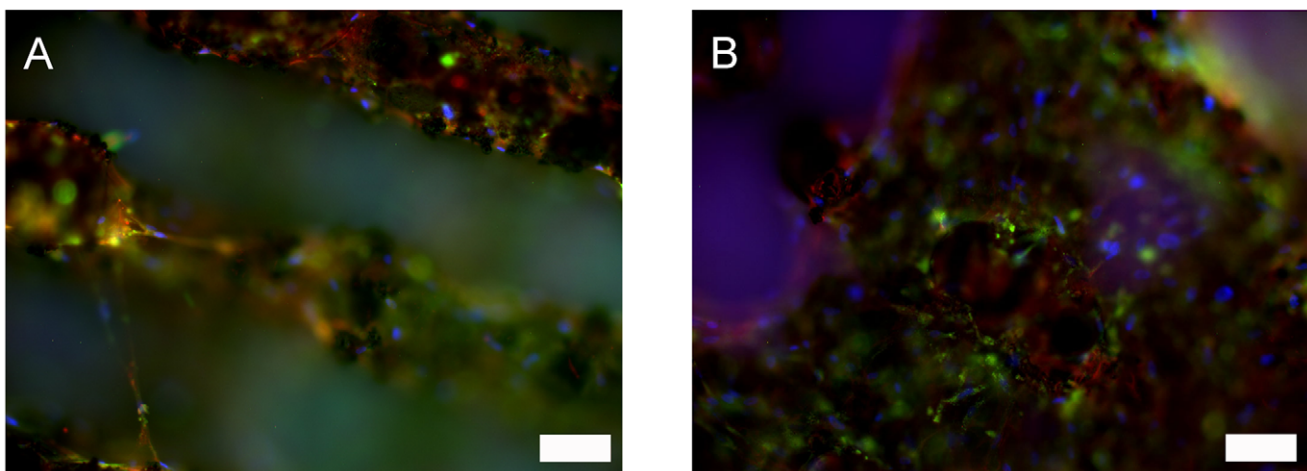
### Forensic Snares

On account of the European Commission Directives 2006/17/EC [48] and 2006/86/EC [49] a license is needed to procure, process and if necessary store human autologous cells. Attending surgeons have to apply for a license by national institutions or make a draft on a tissue establishment. Nevertheless, our approach might be of clinical relevance as the use of certified kits and machines is covered by national legislations.

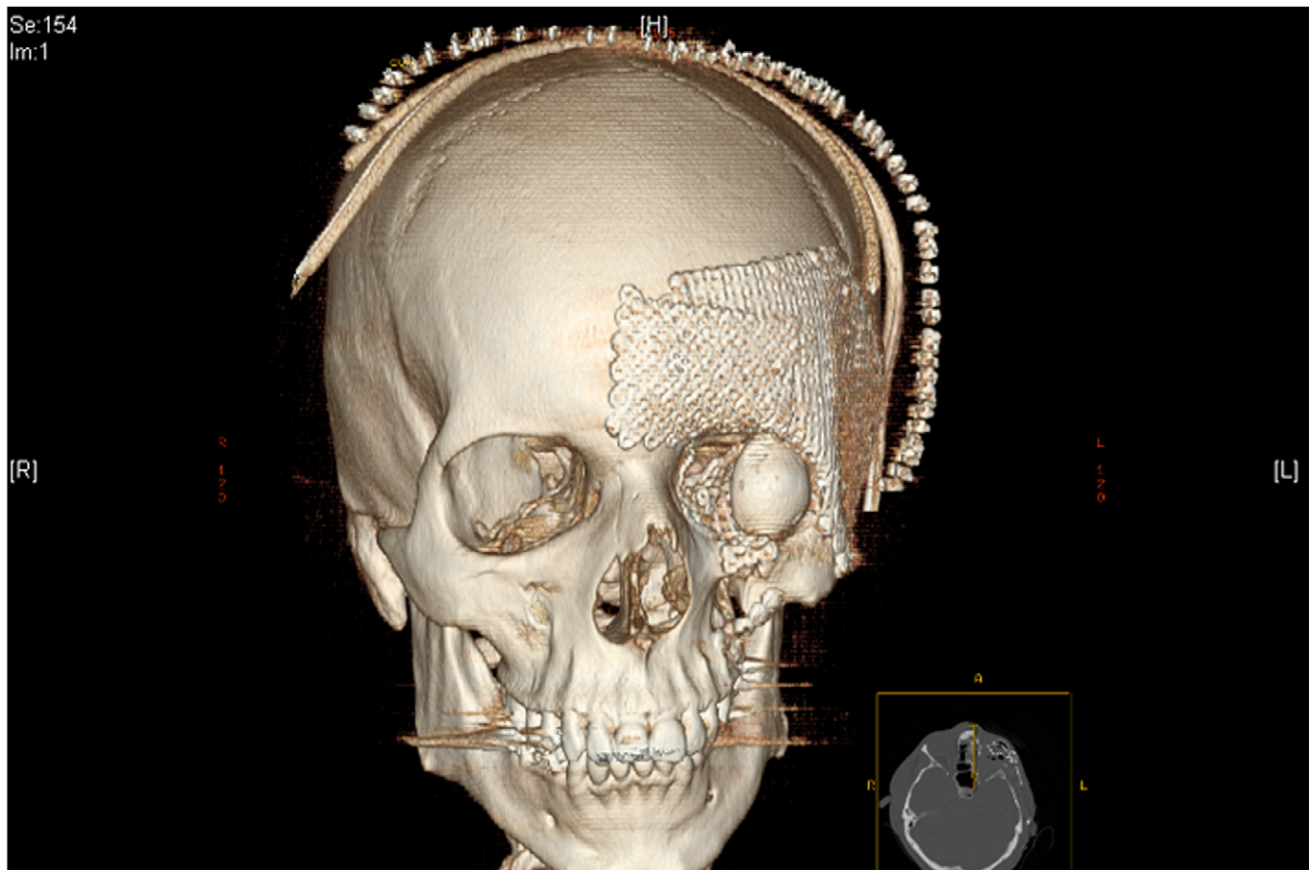




**Figure 12. Alizarin red staining of mechanically differentiated ASCs.** A and B: digital 3d-microscopy of rounded side; scale bars 1 mm (A), 150  $\mu\text{m}$  (B) C and D: light microscopy of flat side (A) which was in contact to clamp and rounded side. (B); scale bars 1 mm.  
doi:10.1371/journal.pone.0051264.g012



**Figure 13. Expression of osteogenic markers in mechanically differentiated ASCs.** A: green: osteocalcin, red: collagen type I, blue: nuclei; scale bar 100  $\mu\text{m}$ . B: green: bone alkaline phosphatase, red: fibronectin, blue: nuclei; scale bar 100  $\mu\text{m}$ .  
doi:10.1371/journal.pone.0051264.g013



**Figure 14. Possible application for NiTi-hybrid-implant (image created by Prof. Vogt and Prof. Gellrich, Hannover Medical School).**  
doi:10.1371/journal.pone.0051264.g014

## Conclusion

SLM-fabricated 3d-microstructured NiTi-scaffolds combined with autologous ASCs offer new perspectives for customized osteoimplants especially for reconstruction of fine structures as necessary in the human face. As the problem of NiTi reset temperature has been solved [20], further studies have to reveal the necessary reset forces of the alloy for induction of osteogenic differentiation in detail. In animal experiments the possible ingrowth of blood vessels should be evaluated.

## References

- Shabalovskaya SA (1996) On nature of the biocompatibility and on medical applications of NiTi shape memory and superelastic alloys. *Bio-Med Mater Eng* 6: 267–89.
- Blackwood DJ (2003) Biomaterials: past successes and future problems. *Corros Rev* 21: 97–124.
- Morgan NB (2004) Medical shape memory alloy applications – the market and its products. *Mater Sci Endg – Struct mater Prop Microstruct Proc* 378: 16–23.
- Bobyn CE, Mortimer ES, Glassman AH, Engh CA, Miller JE, et al. (1992) Producing and Avoiding Stress Shielding: Laboratory and Clinical Observations of Noncemented Total Hip Arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 274: 79–96.
- Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, et al. (1998) Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 16: 155–162.
- Habijan T (2009) Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen auf Nickel-Titan-Formgedächtnislegierungen, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum.
- Habijan T, Glogowski T, Kühn S, Wittsiepe J, Greulich C, et al. (2011) Can human mesenchymal stem cells survive on a NiTi implant material subjected to cyclic loading? *Acta Biomaterialia* 7: 2733–2739.
- Zuk P, Zhu M, Ashjian P, De Urganje d, Huang J, et al. (2003) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the cell* 13: 4279–4295.
- Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, et al. (2005) Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue and umbilical chord blood. *Exp Hematology* 33: 1402–1416.
- Pu LLQ (2012) Towards more rationalized approach to autologous fat grafting. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery* 65: 413–419.
- Shabalovskaya SA (2001) Physiochemical and biological aspects of nitinol as a biomaterial; *Int Mater Rev* 46: 230–250.
- Kujala S, Ryhänen J, Danilov A, Tuukkanen J (2003) Effect of porosity on the osteointegration and bone ingrowth of a weight-bearing nickel titanium bone graft substitute. *Biomaterials* 24: 4691–4697.

## Acknowledgments

The authors wish to thank G. Preiss (Institute for Cellular Biology, Hannover Medical School) for technical support regarding scanning electron microscopy and Prof. Dr. Gellrich (Clinic for Cranio-Maxillo-Facial Surgery, Hannover Medical School) for providing Figure 14.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SS KR PV. Performed the experiments: SS. Analyzed the data: SS KR MF. Contributed reagents/materials/analysis tools: KR SD RH SB MI DK JK CR PV. Wrote the paper: SS KR. Fabricated the NiTi structures: SD RH. Calculated the applied forces: MF.

13. Köhl M, Habijan T, Bram M, Buchkremer HP, Stöver D, et al. (2009) Powder metallurgical near net shape fabrication of porous NiTi shape memory alloys for use as long-term implants by the combination of metal injection molding process with the space holder technique. *Adv Engineering Materials* 12: 959–968.
14. Lee KW, Wang S, Yazemski MJ, Lu L (2010) Enhanced cell ingrowth and proliferation through three-dimensional nanocomposite scaffolds with controlled pore structures. *Biomacromolecules* 11(3): 682–689.
15. Bram M, Ahmad-Khanlou A, Heckmann A, Fuchs B, Buchkremer HP, et al. (2002) Powder metallurgical fabrication processes for NiTi shape memory alloy parts. *Material Science and Engineering* 337: 254–263.
16. Dudziak S, Gieseke M, Haferkamp H, Barcikowski S, Kracht D (2010) Functionality of laser-sintered shape memory alloy micro actuators. *Physics Procedia* 5B: 607–615.
17. Barcikowski S, Hahn A, Guggenheim M, Reimers K, Ostendorf A (2010) Biocompatibility of nanoactuators: stem cell growth on laser-generated nickel-titanium shape memory alloy nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research* 12: 1733–1742.
18. Pfeiffer R, Herzog D, Husted M, Barcikowski S (2010) Pulsed Nd:YAG laser cutting of NiTi shape memory alloys – Influence of process parameters. *J. Mater. Process Tech.*
19. Hahn A, Fuhlrott J, Loos A, Barcikowski S (2012) Cytotoxicity and ion release of alloy nanoparticles. *J Naopart Res* 14: 686–696.
20. Dudziak S (2012) Beeinflussung der funktionellen Eigenschaften aktorischer Nickel-Titan-Legierungen durch die aktiven Parameter im Mikrolaserschmelzprozess. *Berichte aus dem LZH* ISBN: 978-3-943104-43-1.
21. Kuhbier J, Weyand B, Sorg H, Radtke C, Vogt PM, et al. (2010) Stammzellen aus dem Fettgewebe. *Chirurg* 81: 826–832.
22. Gebert A, Preiss G (1998) A simple method for the acquisition of high-quality digital images from analog scanning electron microscopes. *Journal of microscopy* 191; 3: 297–302.
23. Wiegand H, Kloss KH, Thomala W (2007) *Schraubenverbindungen: Grundlagen, Berechnung, Eigenschaften, Handhabung*. Springer Verlag, ISBN-13 978-3-540-2182-9.
24. Verein Deutscher Ingenieure (2003) VDI 2230: Systematic calculation of high duty bolted joints. VDI-Gesellschaft Entwicklung Konstruktion Vertrieb.
25. Hollander D, Wirtz D, von Walter M, Linker R, Schultheis A, et al. (2003) Development of individual three-dimensional bone substitutes using “selective laser melting” *European Journal of Trauma* 29: 228–234.
26. Deligianni D, Katsala N, Ladas S, Sotiropoulou D, Amedec J, et al. (2001) Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption *Biomaterials* 22: 1241–1251.
27. Wever DJ, Veldhuizen AG, Sanders MM, Schakenraad JM, van Horn JR (1997) Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy. *Biomaterials* 18; 16: 1115–1120.
28. Jeswani S, Alexander MJ (2011) Nickel allergy: a reason for concern? *J Neuro Intervent Surg* 3: 2–4.
29. Habijan T, Glogowski T, Kühn S, Pohl M, Muhr G, et al. (2009) Experimental setup for high strain induction to cell loaded metallic materials. *IFMBE Proceedings* 22; 17: 2165–2168.
30. Schmidt M, Badrinarayanan R, Müller V, Vogl T, Fejer G, et al. (2010) Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nature Immunology* 11: 814–820.
31. Kavesh K, Ibrahim R, Abu Bakar Z, Ibrahim TA (2011) Mesenchymal stem cells, osteogenic lineage and bone tissue engineering: a review. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 10: 2317–2330.
32. Mischen BT, Vollmar KE, Moyer KE, Buehrer B, Olbrich KC, et al. (2008) Metabolic and functional characterization of human adipose derived stem cells in tissue engineering. *Plast Reconstr Surg* 122: 725–738.
33. Tjabringa GS, Vezeridis PS, Zaandieh-Doulabi B, Helder MN, Wuismann PI, et al. (2006) Polyamides modulate nitric oxide production and COX-2 gene expression in response to mechanical loading in human adipose derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24: 2262–2269.
34. Van Griensven M, Diederichs S, Roeker S, Boehm S, Peterbauer A, et al. (2009) Mechanical straining using 2d and 3d bioreactors induces osteogenesis: implications for bone tissue engineering. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 112: 95–123.
35. Folkman J, Hochberg M (1973) Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med.* 138: 745–753.
36. Lu ZF, Roohani-Esfahani SI, Wang G, Zreiqat H (2012) Bone biomimetic microenvironment induces osteogenic differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Nanomedicine* 8: 507–515.
37. Kaully T, Kaufman-Francis K, Lesman A, Levenberg S (2009) *Tissue Engineering Part B: Reviews* 15(2): 159–169.
38. Papavasiliou G, Cheng MH, Brey EM (2010) Strategies for vascularisation of polymer scaffolds. *J Investig Med* 58(7): 838–844.
39. Unger RE, Sartoris A, Peters K, Motta A, Migliarsi C, et al. (2007) Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials* 28: 3965–3976.
40. Assad M, Jarzem P, Leroux MA, Coillard C, Chernyshov AV, et al. (2003) Porous titanium-nickel for intervertebral fusion in a sheep model: Part 1. Histomorphometric and radiological analysis. *J Biomed Mat res Part B – Appl Biomater* 64B: 107–120.
41. Wang M, Crisostomo P, Herring C, Meldrum K, Meldrum D (2006) Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: 880–884.
42. Schäffler A, Büchler C (2007) Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells - Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. *Stem Cells* 25: 818–827.
43. Nikanorov A, Smouse HB, Osman K, Bialas M, Shrivastava S, et al. (2008) Fracture of self-expanding nitinol stents stressed in vitro under simulated intravascular conditions. *J Vasc Surg* 48: 435–440.
44. Heintz C, Riepe G, Birken L, Kaiser E, Chakfé, et al (2001) Corroded Nitinol Wires in Explanted Aortic Endografts: An Important Mechanism of Failure? *J Endovasc Ther* 8: 248–253.
45. Peng B, Shen Y, Cheung GSP, Xia TJ (2005) Defects in ProTaper S1 instruments after clinical use: longitudinal examination. *International Endodontic Journal* 38: 550–557.
46. Robertson SW, Ritchie RO (2012) Mechanical fatigue and fracture of Nitinol. *International Materials Reviews* 57: 1–36.
47. McKelvey AL, Ritchie RO (2001) Fatigue-crack growth behaviour in the superelastic and shape-memory alloy nitinol. *Metallurgical and Materials Transactions A* 32: 731–743.
48. European Commission Directive 2006/17/EC. *Official Journal of the European Union* 9.2.2006.
49. European Commission Directive 2006/86/EC. *Official Journal of the European Union* 25.10.2006.



# Adhesion, Vitality and Osteogenic Differentiation Capacity of Adipose Derived Stem Cells Seeded on Nitinol Nanoparticle Coatings

Sarah Strauß<sup>1\*</sup>, Anne Neumeister<sup>2</sup>, Stephan Barcikowski<sup>2,3</sup>, Dietmar Kracht<sup>2</sup>, Jörn W. Kuhbier<sup>1</sup>, Christine Radtke<sup>1</sup>, Kerstin Reimers<sup>1</sup>, Peter M. Vogt<sup>1</sup>

**1** Department for Plastic- Hand- and Reconstructive Surgery, Hannover Medical School, Hannover, Germany, **2** Laser Zentrum Hannover e.V., Hannover, Germany, **3** Technical Chemistry I and Centre for Nanointegration, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany

## Abstract

Autologous cells can be used for a bioactivation of osteoimplants to enhance osseointegration. In this regard, adipose derived stem cells (ASCs) offer interesting perspectives in implantology because they are fast and easy to isolate. However, not all materials licensed for bone implants are equally suited for cell adhesion. Surface modifications are under investigation to promote cytocompatibility and cell growth. The presented study focused on influences of a Nitinol-nanoparticle coating on ASCs. Possible toxic effects as well as influences on the osteogenic differentiation potential of ASCs were evaluated by viability assays, scanning electron microscopy, immunofluorescence and alizarin red staining. It was previously shown that Nitinol-nanoparticles exert no cell toxic effects to ASCs either in soluble form or as surface coating. Here we could demonstrate that a Nitinol-nanoparticle surface coating enhances cell adherence and growth on Nitinol-surfaces. No negative influence on the osteogenic differentiation was observed. Nitinol-nanoparticle coatings offer new possibilities in implantology research regarding bioactivation by autologous ASCs, respectively enhancement of surface attraction to cells.

**Citation:** Strauß S, Neumeister A, Barcikowski S, Kracht D, Kuhbier JW, et al. (2013) Adhesion, Vitality and Osteogenic Differentiation Capacity of Adipose Derived Stem Cells Seeded on Nitinol Nanoparticle Coatings. PLoS ONE 8(1): e53309. doi:10.1371/journal.pone.0053309

**Editor:** Adam J. Engler, University of California San Diego, United States of America

**Received:** August 7, 2012; **Accepted:** November 27, 2012; **Published:** January 7, 2013

**Copyright:** © 2013 Strauß et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The study has been funded by the German Research Foundation within the Collaborative Research Centre TransRegio 37 'Micro- and Nanosystems in Medicine – Reconstruction of biologic Functions'. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: [strauss.sarah@mh-hannover.de](mailto:strauss.sarah@mh-hannover.de)

## Introduction

Bone tissue engineering is an attractive field with regard to clinical application to bridge bone tissue defects e.g. after tumor resection. Engineering of a piece of bone, as it is needed for bone substitution in bigger defects, is impossible in present state of scientific and technical knowledge. Furthermore, time needed for bone engineering in vitro makes a usage for acute incidences complicated. Up to now, large bone defects are treated by dense implants or autologous transplants, e.g. solid grafts from the fibula or cancellous bone from the iliac crest, with resulting donor morbidity. Nevertheless, withdrawal of autologous transplants is a serious load for the patient while synthetic implants made from dense metal or ceramics often are accompanied with a lack of osseointegration [1].

In this context Nitinol (NiTi) – an alloy consisting of nickel and titanium – is a promising material for dense implants. Concerning flexibility and stability NiTi shape memory alloys (SMAs) show bone related characteristics, which render them predestinated as an implant material [2,3,4,5].

However, fast and stable osseointegration still remains a challenge. Particularly, integration of plane surfaces is often inadequate. Many studies are focusing on the surface characteristics and their optimization. It has been shown that rough surfaces

are advantageous for cell adhesion. Especially nanostructuring of surfaces can enhance cell adhesion and thereby improve osseointegration of the implant adhesion [1,6,7,8,9].

In this context, surface coating using nanoparticles is a simple method to create a nanoscaled surface structure [10]. In order to prevent unwanted physical and/or chemical interactions between surface and nanoparticles, usage of similar materials for both is a promising option. A study with human primary endothelial and smooth muscle cells regarding the cytotoxicity of NiTi-nanoparticles revealed that potential toxicity depends partly on the additive used to stabilize nanoparticle colloids [11]. In combination with an appropriate additive colloid nanoparticles (unbound nanoparticles) have to be concentrated 6 times higher than needed to coat an area with a nanoparticle monolayer covered by a single cell to reach toxic levels. So even in the unlikely case of a complete detachment of nanoparticles from the coating of the implant the nanoparticle concentration can not reach a level which is toxic to the cells [12].

Another strategy to enhance implant integration exploits the bioactivation of surfaces by preseeding with autologous mesenchymal stem cells (MSCs) from the bone marrow. In vivo these are the source of cells differentiating to osteoblasts which build the bone. Studies of Bruder et al. showed an enhanced osseointegration of ceramic implants which had been preseeded with



autologous MSCs [13]. It was recently demonstrated that MSCs from bone marrow aspirates adhere and differentiate osteogenically on NiTi [14,15].

While for MSC isolation a bone marrow aspirate or a biopsy has to be taken, with all its risks for the patient (e.g. osteomyelitis), adipose derived stem cells (ASCs) can be isolated easily in considerable numbers from subcutaneous fat. 1 g of adipose tissue yields approximately  $5 \times 10^3$  stem cells, which is 500 times greater than the number of MSCs in 1 g of bone marrow [16].

ASCs are able to differentiate osteogenically [18,19] and therefore are a promising alternative to MSCs regarding the pre seeding of implant surfaces. ASCs were already applied successful for the clinical treatment of wounds or contour defects [20]. In a case report, Lendeckel et al. successfully treated a calvarial bone defect with ASCs [21].

In summary, the ideal NiTi-osteointegration can be bioactivated with ASCs. As roughness is an important factor for cell adhesion and osseointegration [1,6,7,8,9] a coating utilizing NiTi-nanoparticles could ameliorate the attachment of cells on the implant.

In previous studies Barcikowski et al. showed that ASCs are able to grow on cover glasses coated with NiTi-nanoparticles [22]. Although their data indicated that NiTi-nanoparticles do not exert a negative influence on ASCs, cytocompatibility has not been studied in detail yet. For that reason the interactions of these cells with NiTi-nanoparticles still remain unclear. The study at hand analyzes adhesion, cell viability, growth and proliferation as well as osteogenic differentiability of ASCs on coatings with NiTi-nanoparticles. Here, human ASCs were seeded on NiTi-sheets which were half-side coated with NiTi-nanoparticles by two different coating methods (see methods part) and additionally, on NiTi-coated and uncoated cover glasses. In order to exclude possible adverse nanoparticle-related effects, cell reactions on colloidal NiTi-nanoparticles were investigated as well.

Cell viability was evaluated by life/dead assay. Metabolic activity and adhesion were determined. Moreover, cell morphology and osteogenic differentiation were analyzed by scanning electron microscopy and immuno- and histochemical stainings.

## Methods

### ASC-isolation and cultivation

Human ASCs were isolated from fat tissue obtained from eleven male and female donors aged between 16 and 40 years after obtaining the written informed consent from the patients following ethic standards as described previously [16,17]. The obtained tissue was used anonymously. Fat was separated from the dermo-epidermal layer, minced with sterile scissors followed by enzymatic digestion with 0.075% collagenase CLS (Biochrom AG, Berlin, Germany) in PBS (Biochrom) for 30 minutes at 37°C under permanent shaking. Cell containing liquid was centrifuged at  $1.200 \times g$  at room temperature for 10 minutes. Cells were cultivated in DMEM/Hams-F12 (PAA) with 10% fetal calf serum (FCS) (Biochrom), 50 U/ml penicillin/streptomycin (Biochrom), 10 ng/ml FGF and 50 µg/ml ascorbate-2-phosphate (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. For analyses cells in passage 3 to 5 were seeded on cover glasses and Nitinol-surfaces with and without nanoparticle-coatings. Cultivation time varied according to analyses between 24 hrs, 48 hrs and 6 weeks (for osteogenic differentiation).

### Osteogenic differentiation

Osteogenic differentiation was induced by application of dexamethasone and glycerol-2-phosphate disodium salt. Accordingly cells were cultivated up to 6 weeks in DMEM/Hams-F12

with 10% FCS, 50 U/ml penicillin/streptomycin, 50 µg/ml ascorbate-2-phosphate, 39.3 ng/ml dexamethasone (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) and 0.756 mg/ml glycerol-2-phosphate disodium salt (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany). Medium was changed three times per week.

### RAW264.7 cultivation

The murine macrophage cell line RAW264.7 (ATCC, Manassas, USA) was cultivated with DMEM high glucose (PAA) containing 10% FCS, 50 U/ml penicillin/streptomycin and 0.1 mg/ml sodium-pyruvate (PAA) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

### Nanoparticle production

NiTi- (average hydrodynamic diameter of 60 nm), Ti- and Ni- and Ag-nanoparticles were produced using laser ablation in liquids as previously described [22]. The pulse energy of the femtosecond laser was 200 µJ and the laser beam speed rate  $1 \text{ mm s}^{-1}$ . Laser ablation was carried out in double distilled aqueous solution of citrate or cysteine, both with a final concentration of 5 mM. Nanoparticle concentration ranged from 80 to 282 µg/ml due to the fabrication processes. Dispersions were diluted with distilled water to 2 µg/ml for cell viability tests.

### Surface coating

**Depending on the requirements of analyses two different coating methods were used.** While homogenous coatings could be deposited on conductive surfaces by electrophoretic deposition, drying allowed deposition of defined quantities of nanoparticles on non-conductive surfaces like cover glasses.

Electrophoretic deposition of nanoparticles was done by applying voltage (5 V per cm for 1 h) to two NiTi-sheets (Alloy M, Memory-Metalle GmbH, Weil am Rhein, Germany) which were aligned in parallel order and immersed in the nanoparticle dispersion with a distance of 1 cm between the sheets. By application of voltage the two sheets worked as electrodes. As the colloidal NiTi-nanoparticles have a negative zeta-potential they move through the electric field to the anode and deposit there [12].

Deposition by drying was carried out by dropping defined concentrations (10 to 100 µg/cm<sup>2</sup>) of colloidal nanoparticles on “activated” (pretreated with nitric acid) cover slips. Subsequently, samples were air-dried. While the solvents disappeared, nanoparticles were left as a coating on the surface [12].

All NiTi-sheets used were martensitic and did not change to austenitic phase when sterilized by autoclaving (according to manufacturer’s data). Sheets were produced by rolling, so surfaces showed the typical structure with small furrows.

### Cell viability

Cell viability was tested by live/dead assay (Invitrogen, La Jolla, USA, #L3224) and cell titer blue assay (Promega, Mannheim, Germany, #8082).

For live/dead assay ASCs were seeded on cover glasses and NiTi-surfaces with or without NiTi-, Ni-, Ag- and Ti-nanoparticle coatings. To analyze the influence of the materials on undifferentiated ASCs, cells were cultivated for 24–48 hrs on the respective surfaces. Osteogenically differentiated cells were analyzed after 6 weeks of cultivation with osteogenic medium. To perform the assay, cells were incubated with commercially available live/dead solution for 30 min and then analyzed by fluorescence microscopy (Olympus CK40, Cell D). Living cells were stained green by calcein, dead cells red by ethidium-homodimer-1.

Cell titer blue assays were performed in 96-well plates.  $10^5$  cells per well were seeded in duplicates on coated and uncoated NiTi surfaces and incubated for 48 hrs. To analyze effects of colloidal nanoparticles 10000 cells per well were seeded and incubated for 24 hrs. Colloidal NiTi, Ti-, Ni-nanoparticles in  $H_2O$ , 5 mM citrate or 5 mM cysteine were added to 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  as final concentrations of nanoparticles. Solutions of 5 mM citrate or 5 mM cysteine without nanoparticles served as controls. After 24 and 48 hrs incubation cell titer blue solution was added and incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 4 hrs. Cells metabolize resazurine via reduction to resorufin which can be excited to fluorescence at 590 nm. The produced fluorescence intensity is thus proportional to the number of viable cells. Fluorescence was measured with a Tecan GENios multiwell reader (Tecan, Männedorf, Swiss).

### Statistical analyzes

Statistical analyzes were performed with Graph Pad Prism Software. To check statistical significance of the measured metabolic activities (see above) one way ANOVA, followed by Dunnetts post hoc test were carried out.

### Immunofluorescence

Immunofluorescence was performed on NiTi-nanoparticle coated and uncoated cover glasses.  $10^5$  cells were seeded on cover glasses and incubated for 48 hrs and up to 6 weeks and then fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) for 20 min, blocked and permeabilized for  $3 \times 5$  min with PBS containing 0.1% TritonX-100 and 1% BSA. Primary antibodies against integrins  $\alpha_5$  (Chemicon #MAB1978) and  $\beta_1$  (Chemicon #MAB1959), fibronectin (Acris #R1154PX, according to manufacturers data no cross reactions to other species), tubulin (abcam #ab6160-100), bone alkaline phosphatase (abcam, #ab108337, ab17272), osteocalcin (abcam, #ab13420), tubulin (abcam #ab6160) and the actin cytoskeleton marker phalloidine-FITC (Invitrogen #F432) were used in dilutions of 1:500 and incubated at room temperature for 1 h. The samples were washed with PBS containing 0.1% TritonX-100 and 0.1% BSA. Secondary antibodies coupled to Alexa 546 (Invitrogen #A11056, A10036, A11060) and Alexa 488 (Invitrogen #A21200, A11059, A21441) were used at dilutions between 1:1000 and 1:4000. Samples were washed several times with PBS w/o Ca. Nucleic staining was performed with DAPI included in the mounting medium (Vectorshield #H-1200). Samples were analyzed by fluorescence microscopy (Zeiss Axiovert 200M, AxioVision; Olympus SZX16, Cell F).

### Alizarin red staining

Calcium deposits of cells, which are characteristics of bone tissue, were detected by alizarin red staining. ASCs were seeded on NiTi-sheets and coated cover glasses. Osteogenic differentiation was induced by culture media for 6 weeks. Samples were fixed with 3.7% formalin. Specimens were rinsed with tap water for 1 h and washed with 0.1 M boric acid (pH 4). Afterwards they were incubated in alizarin red solution (0.5%, pH 4, A-5533, Sigma Aldrich) for 1 h, rinsed with boric acid, washed with distilled water, rinsed with 95% ethanol and then air dried. Samples were analyzed by reflected-light microscopy (Olympus SZX16, Cell F) and digital microscopy (VK-9700 and VHX, Keyence with VK-Analyzer).

### Scanning electron microscopy

Cells on scaffolds were cultured for 24 hrs and up to 6 weeks (osteogenic differentiation). Samples were fixed in 0.2 M Na-

cacodylate buffer (pH 7.4) with 2.5% glutaraldehyde for 24 hrs, followed by dehydration with acetone (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) for  $3 \times 10$  min. Critical point drying was performed with acetone/ $\text{CO}_2$  in CPD 030 system (Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Samples were sputtered with gold (Sem Coating System, Polarion). Scanning electron microscopy was done with a SEM 505 (Philips). Pictures were taken with SEM-Software by Preiss and Gebert [23].

## Results

### NiTi-nanoparticles are not toxic to ASCs and RAW264.7 cells

In order to rule out any harmful influences of NiTi-nanoparticles on ASC growth and vitality a number of assays were performed.

We first compared NiTi nanoparticle bound to NiTi-sheets and uncoated sheets to cells kept on cell culture plastic surfaces. ASCs showed no significant difference on NiTi-nanoparticle-coated and uncoated NiTi-surfaces after 48 hrs of stimulation, when their metabolic activity was measured with CellTiterBlue assay (Fig. 1A).

The influence of unbound nanoparticles was investigated by measurements using colloids. Additionally, cysteine and citrate solutions (5 mM) without nanoparticles were also included as controls since these additives were used as stabilization agents during nanoparticle synthesis. Neither colloidal nanoparticles at their highest concentration of 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  nor their controls did exert a significant negative influence on ASCs' metabolic activity within 48 hrs. 10% DMSO and Ni-sheets, which are toxic to cells, served as positive controls and caused a significant loss of metabolic activity as the cells died (Fig. 1B).

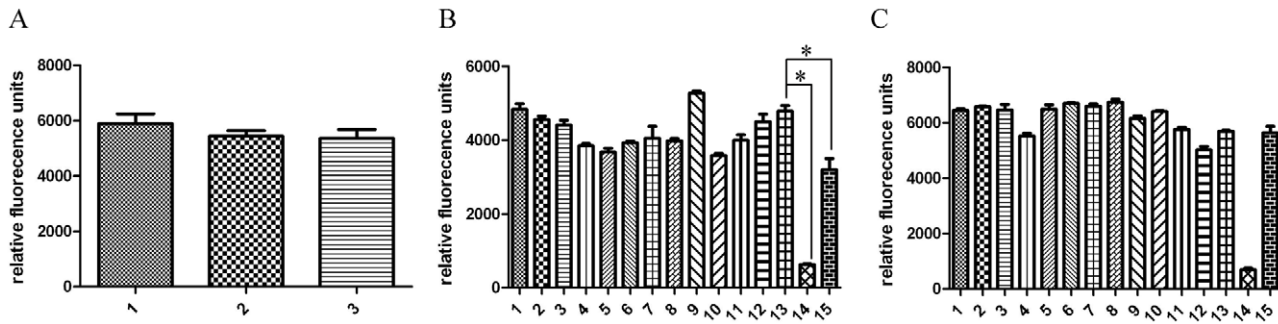
A loss of activity of cells which were cultivated with Nitinol would have implicated a toxic effect of the alloy. As results were comparable to cells grown under normal cell culture conditions one can conclude that Nitinol in the tested forms has no toxic influence on metabolic activity of ASCs (Fig. 1A and B).

Murine macrophages were checked for metabolic activities after 48 hrs to get hints on possible immune reactions to the presence of NiTi-nanoparticles. No significant enhancement or decrease of cell metabolism was observed for all materials and solvents tested. A reaction to the tested concentration of colloidal nanoparticles would have implied an activation of these macrophages or cell death with loss of metabolic activity. As activation or loss of activity did not occur, we assessed the tested nanoparticle-concentration as uncritical for macrophages in vitro. (Fig. 1C)

### Cell adhesion on NiTi-nanoparticle-coated surfaces as a prerequisite of osteogenic differentiation

In a first series of experiments NiTi nanoparticle coated cover glasses were seeded with ASCs for 48 hrs. Cover glasses were treated as described above to achieve a coating density of 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  and 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

Cells had the typical spindle-shaped morphology on uncoated glass controls and were vital to a large extent (Fig. 2A). On coated specimen (Fig. 2B and C) cell attachment appeared punctual in dependence of coating density in microscopic visualization. Green fluorescence, however, indicated that cell viability was unaffected by glass treatment. Interestingly, the non-fluorescent spaces between the cells were reduced in correlation with increasing nanoparticle concentration so cells appeared more confluent on coated surfaces in the first 48 hrs (Fig. 2). Even on Ni- and Ag-nanoparticle coated cover glasses the relative amounts of vital ASCs have been found to be higher than 50% (data not shown)



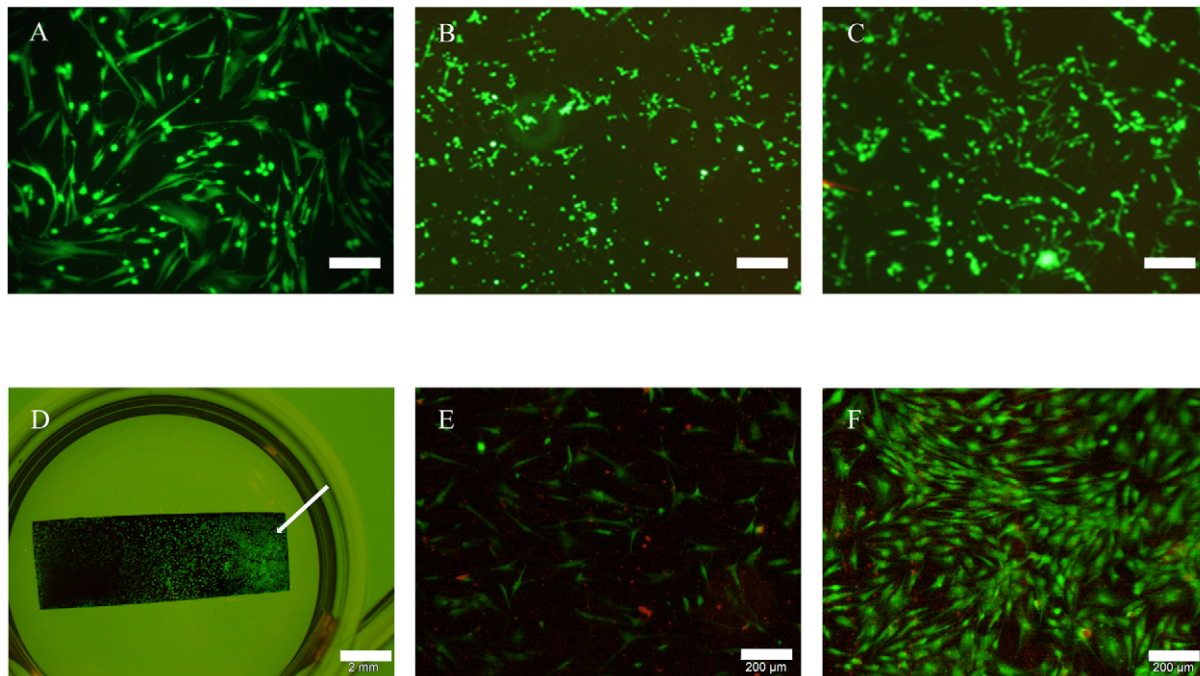
**Figure 1. Metabolic activity after 48 hrs stimulation.** A: ASCs on NiTi sheets (1), NiTi-nanoparticle coated NiTi-sheets (2) and cell culture plastic (3) showed no significant differences in metabolic activity. B: ASCs incubated with nanoparticle colloids and/or additives on cell culture plastic (1–14) and Nickel sheets (15). C: macrophages incubated with nanoparticle colloids and/or additives on cell culture plastic (1–14) and Nickel sheets (15). B & C: 1: H<sub>2</sub>O, 2 Citrate (Ci), 3 Cystein (Cy), 4 NiTi H<sub>2</sub>O, 5 NiTi Ci, 6 NiTi Cy, 7 Ti H<sub>2</sub>O, 8 Ti Ci, 9 Ti Cy, 10 Ni H<sub>2</sub>O, 11 Ni Cy, 12 Ni Cy, 13 cell culture medium, 14 DMSO, 15 Ni sheet. Statistical analysis of metabolic assay was performed with graph pad prism software by using one way ANOVA, followed by Dunnetts post hoc test. Only control without stimulation (B13) compared to DMSO control (B14) and stimulation with nickel (B15) showed significant changes in metabolic activity (indicated by asterisk). doi:10.1371/journal.pone.0053309.g001

although both types of nanoparticles are known for toxic effects in different settings [11,12].

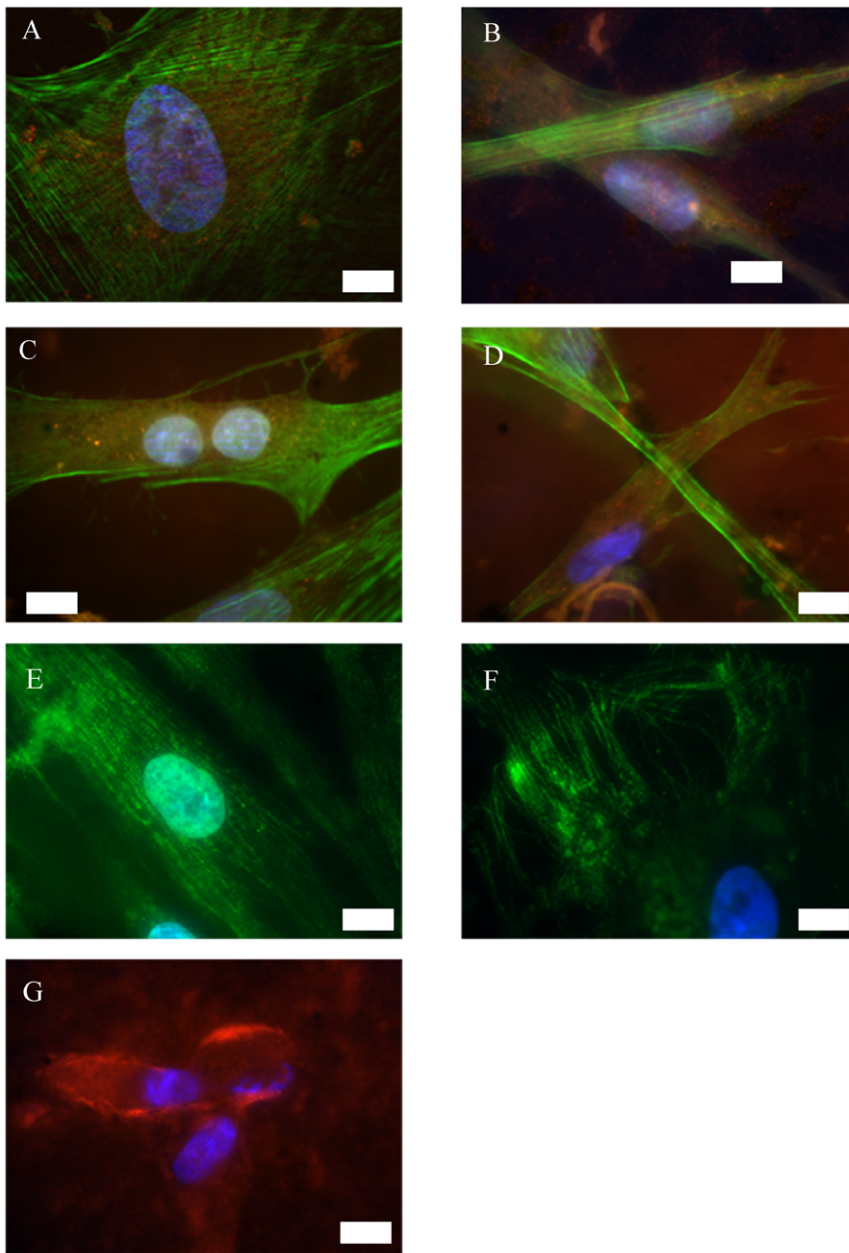
Furthermore, we analyzed the effect of NiTi nanoparticle coating on cell attachment. To this end, we coated NiTi-sheets with NiTi nanoparticles via electrophoretic deposition. The sheets were partially coated, while one half was left without particles the other was coated with 30 to 300  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Figures 2D, 2E, 2F show representative results obtained with a concentration of 300  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . A cell suspension of ASCs was added to the sheets and covered with access volume of medium. Cellular attachment preferentially occurred on the coated half of the sheets (Fig. 2D).

Cells grew to a much lesser extent on uncoated parts and several dead cells were observed as indicated by red nuclei (Fig. 2E). The common spindle-like morphology was observed by reflected light microscopy on uncoated and coated parts (Fig. 2F). This indicates that the punctual appearance of the samples of cover glasses was caused by loss-of-signal due to nanoparticles.

Nevertheless, we further characterized ASCs adhesion on NiTi-nanoparticle coated cover glasses by several immunostainings. This time a higher resolution epifluorescence was chosen to allow the full observation of cytoskeleton organization. Signal-loss due to nanoparticles was overcome by prolonged exposure times.



**Figure 2. Live/dead assay after cultivation of ASCs for 48 hrs; green: vital cells; red: dead cells.** Cells showed typical morphology in all approaches of which representative examples were shown. Abnormal rates of dead cells were not observed. A: cover glass, scale bar 200  $\mu\text{m}$ . B: cover glass coated with 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  NiTi-nanoparticles, scale bar 200  $\mu\text{m}$ . C: cover glass with coated with 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  NiTi-nanoparticles, scale bar 200  $\mu\text{m}$ . D: NiTi-sheet with partial coating of 300  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  NiTi-nanoparticles (indicated by arrow), scale bar 2 mm. E: detail of NiTi-sheet without coating, scale bar 200  $\mu\text{m}$ . F: detail of NiTi-sheet coated with 300  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  NiTi-nanoparticles, scale bar 200  $\mu\text{m}$ . doi:10.1371/journal.pone.0053309.g002

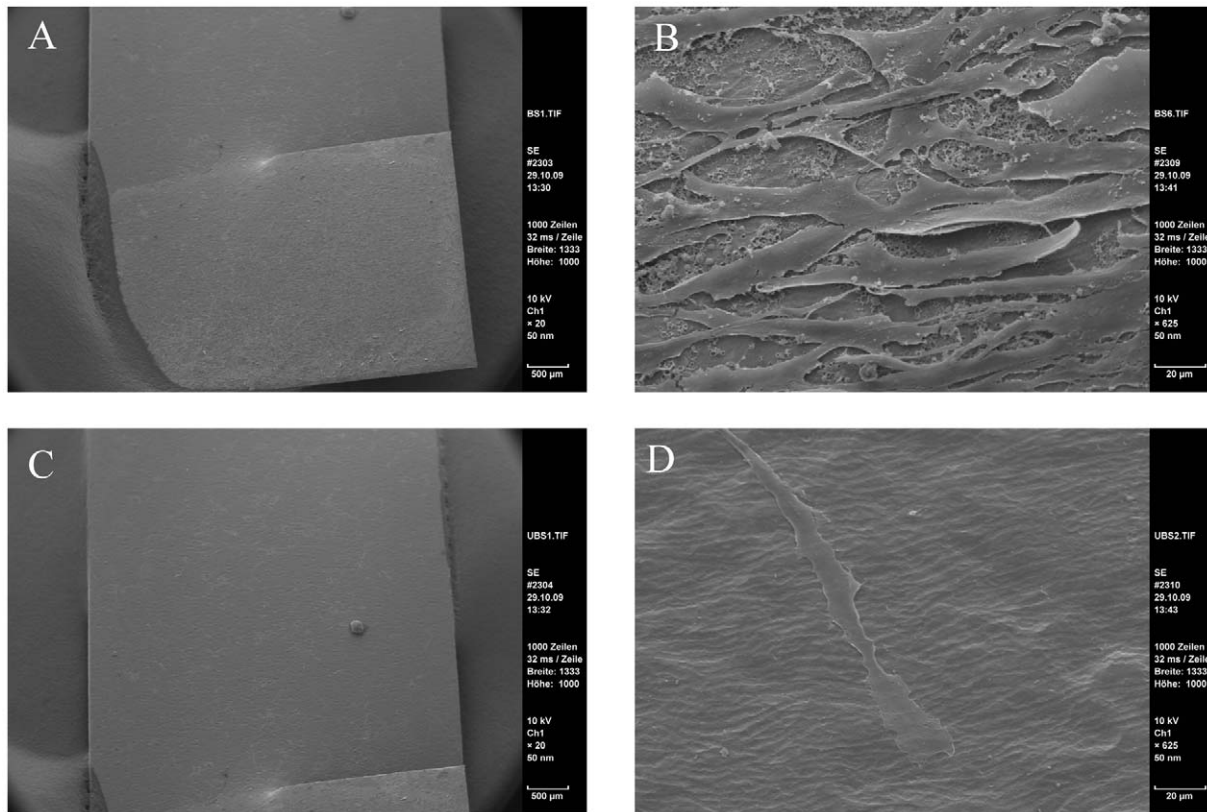


**Figure 3. Immunofluorescence of undifferentiated ASCs on cover glasses with or without NiTi-nanoparticle coating of 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .** Actin and tubulin arrangement is comparable on uncoated and coated glass. Integrins  $\alpha_5$  and  $\beta_1$  are involved in adhesion on both surface types. Cells secrete fibronectin as part of the extracellular matrix. A: uncoated glass; blue: nuclei, green: actin, red: integrin  $\alpha_5$ , scale bar 10  $\mu\text{m}$ . B: coated glass; green: actin, red: integrin  $\alpha_5$ , scale bar 20  $\mu\text{m}$ . C: uncoated glass; blue: nuclei, green: actin, red: integrin  $\beta_1$ , scale bar 20  $\mu\text{m}$ . D: coated glass; blue: nuclei, green: actin, red: integrin  $\beta_1$ , scale bar 20  $\mu\text{m}$ . E: uncoated glass; blue: nuclei, green: tubulin, scale bar 20  $\mu\text{m}$ . F: coated glass; blue: nuclei, green: tubulin, scale bar 20  $\mu\text{m}$ . G: coated glass; blue: nuclei, red: fibronectin, scale bar 20  $\mu\text{m}$ . doi:10.1371/journal.pone.0053309.g003

Integrins  $\alpha_5$  and  $\beta_1$  play a role for osteogenic differentiation of MSCs [6]. We assume that ASCs may behave similar to MSCs, which were already shown to differentiate osteogenic on untreated NiTi [14,15]. These integrins were found to be part of the focal adhesion points of ASCs in the NiTi-nanoparticle group (Fig. 3B, 3C, 3D) as well as in the control group on uncoated cover glasses (Fig. 3A and C) as indicated by spots of red fluorescence. Arrangement of actin cytoskeleton (green fluorescence) was found to be homogenous and did also not differ from controls; no stress fibers were visible in any specimen. Tubulin fibers also appeared

regularly (Fig. 3E and F). All immunofluorescence labelings did not indicate visual differences in cell organization or growth behavior in dependence on the surfaces compared, but the cells adhered efficiently on all NiTi nanoparticle coated surfaces.

Additionally, extracellular matrix secretion was determined. ASCs typically secrete fibronectin as the most prominent part of their extracellular matrix when fully attached to a rigid surface. High amounts of fibronectin were secreted by ASCs grown on NiTi-nanoparticle coated cover glasses (Fig. 3G) and similarly on coated NiTi-surfaces (data not shown).



**Figure 4. SEM pictures of ASCs on NiTi for 48 hrs.** More cells were found on the coated parts of the sheets. There grew with a dimensional shape whereas only few cells were found on the uncoated parts. These cells appeared in a very flat shape. A: NiTi-nanoparticle coated part, overview; scale bar 500 µm. B: coated part, detail; scale bar 20 µm. C: uncoated part, overview; scale bar 500 µm. D: uncoated part, detail; scale bar 20 µm. doi:10.1371/journal.pone.0053309.g004

For all immunofluorescence stainings as an additional negative control nanoparticle-coated surfaces (glass and NiTi) without cells were treated after the same protocol to rule out false results due to unspecific adherence of antibodies to the coating. No unspecific binding of secondary antibodies occurred under the chosen conditions.

All in all no evidence was found that NiTi-nanoparticles have a negative influence on ASCs' adhesion or the organization of their cytoskeleton as these are important factors for cell motility and osteogenic differentiation capacity.

#### ASCs' confluence and dimensional growth appear to be higher on NiTi-nanoparticle coated surfaces

As cell distribution appeared more confluent on coated surfaces in live/dead stainings, we analyzed their growth pattern in a higher resolution in the next step. To this end, samples of partly coated NiTi-sheets seeded with ASCs were visualized by SEM. As a result, we were able to confirm our previous findings by SEM analyzes as such the cells attached densely on the coated part of the sheet (Fig. 4A and 4B) while found sparsely on the bare material (Fig. 4C and 4D). Furthermore, we could observe that ASCs grew not only in dense layers but showed 3-dimensional structures while cells on uncoated parts appeared flat shaped (Fig. 4B and 4D).

#### Osteogenic differentiation of ASCs on NiTi-nanoparticle coating

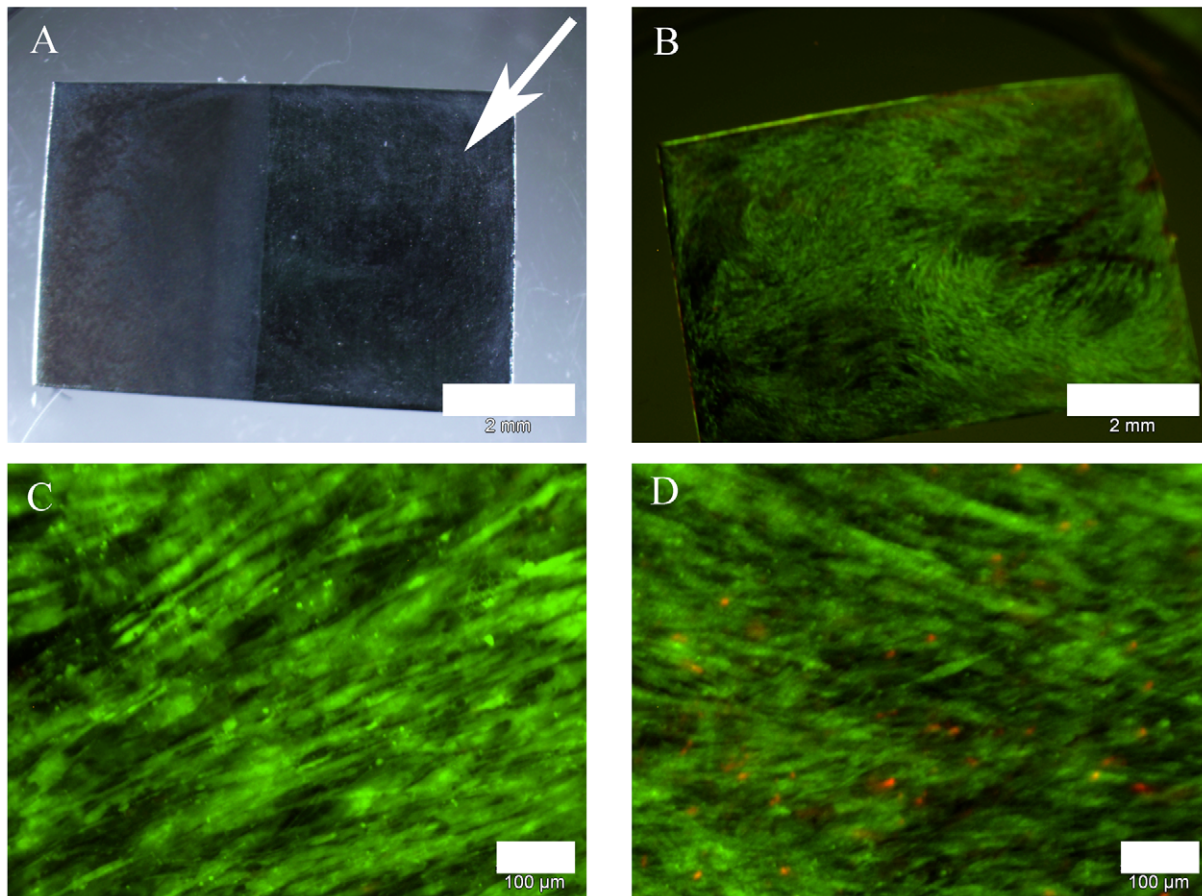
Taking into concern our primary intention to evaluate suitability of NiTi nanoparticles for optimization of NiTi bone

implants, the impact of particle coating on the osteogenic differentiation capacity of ASCs was analyzed. Therefore, samples were treated with osteogenic differentiation medium for up to six weeks. We first analyzed the effect of long-term exposure to NiTi and NiTi nanoparticles by life/dead assay. Although the differences in cell density between the two parts of the sheets (Fig. 5A) were still visible they were less striking than at the short time culture. Nevertheless, cells grew still with a higher density on the coated part and in growth pattern typical for osteogenic differentiation (Fig. 5B). Detailed microscopy showed that there were also differences in cellular vitality. While there could be observed practically no reddish nuclei in the coated part of the samples (Fig. 5C), the uncoated part was characterized by appearance of dead cells (Fig. 5D); even though cells were seeded on the same partly coated sample ensuring to be cultured under the same conditions.

SEM findings after 6 weeks of osteogenic stimulation showed large amounts of extracellular matrix secreted by the cells which grew densely on the NiTi-material. There was no apparent difference between coated and uncoated fractions of the Nitinol surfaces in this kind of analyses (Fig. 6A). A closer look at these samples by violet laser scanning microscopy of the surface showed a more flat shape of the extracellular matrix in contrast to a rough appearance of the matrix on the NiTi-nanoparticle coated half (Fig. 6B, 6C, 6D).

Fibronectin is known to be important for adhesion of osteoblasts on implant substrates *in vitro* [6]. In order to analyze adhesion of osteogenic ASCs, secreted fibronectin was detected by immunofluorescence. Therefore NiTi-nanoparticle coated NiTi-structures





**Figure 5. Osteogenic ASCs on NiTi-sheet, half-coated with NiTi-nanoparticles.** Light microscopic overview shows no visual differences between coated and uncoated parts, whereas live/dead stainings revealed higher rates of vital cells on coated parts. A: light microscopic overview, coated part indicated by arrow; scale bar 2 mm. B: specimen of part A in fluorescence; green: vital cells, red: dead cells; scale bar 2 mm. C: coated part, detail; green: vital cells, red: dead cells; scale bar 100 µm. D: uncoated part, detail; green: vital cells, red: dead cells; scale bar 100 µm. doi:10.1371/journal.pone.0053309.g005

were seeded with ASCs and cultured under osteogenic conditions. After 6 weeks fibronectin was visualized via immunostainings. As shown in fig. 7 osteogenic ASCs on nanosurfaces secrete fibronectin.

Specimens were stained with alizarin red for bone typical calcium depositions. Osteogenic samples were found to be positive (Fig. 8A, 8B, 8C). Further examination by immunofluorescence detected osteocalcin (Fig. 8D) and bone alkaline phosphatase (data not shown). No differences occurred between expression patterns on coated and uncoated surfaces. As undifferentiated ASCs do not express these markers, they served as negative control. Neither alizarin red stainings (Fig. 9A) nor immunofluorescences (Fig. 9B) showed calcium depositions or expression of osteogenic markers in cells cultivated with non-osteogenic medium for 6 weeks. Figure 10 compares alizarin red stainings macroscopically to demonstrate specificity. Calcium depositions were stained with the typical dark red color.

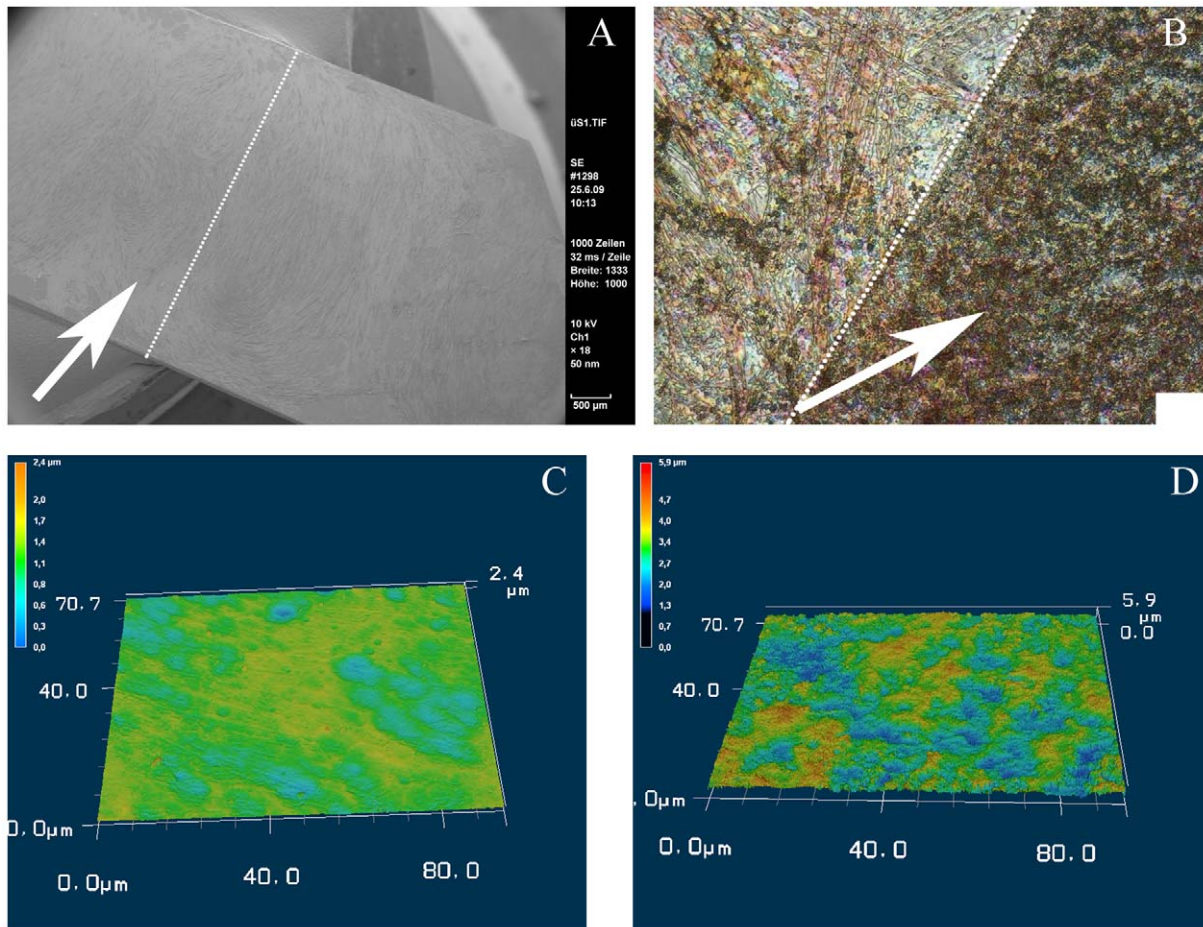
For all immunofluorescence stainings as an additional negative control nanoparticle-coated surfaces (glass and NiTi) without cells were treated after the same protocol to rule out false results due to unspecific adherence of antibodies to the coating. As shown by our results osteogenic differentiation could be induced chemically on uncoated and likewise on coated NiTi-surfaces.

## Discussion

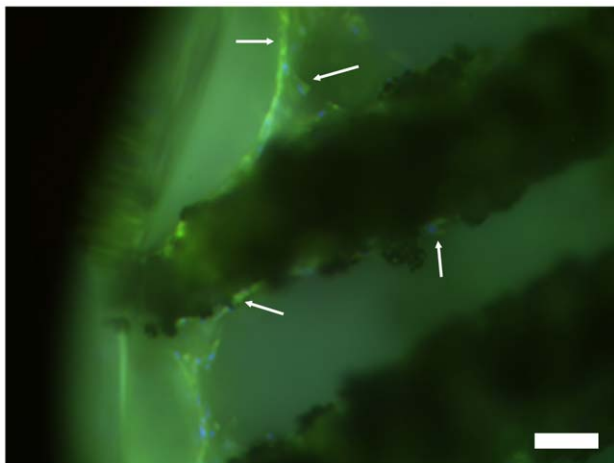
### Toxicity

We could demonstrate that NiTi-nanoparticles coated on surfaces with a concentration up to  $300 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  as well as  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  colloids did not cause toxic effects like lower metabolic activity or enhanced relative amounts of dead cells in cell cultures of ASCs and osteogenically differentiated ASCs. Relative amounts of living cell are comparable to control surfaces (glass, cell culture plastic, uncoated NiTi). These findings correlate with investigations of Hahn et al. regarding the in vitro compatibility of NiTi-nanoparticles with human coronary artery endothelial cells (hCAEC) and human coronary artery smooth muscle cells (hCASMC), which indicated that high concentrations of nanoparticles are needed to induce toxic reactions [11]. These toxic levels can not be achieved with the amount of particles which can be placed under the area of one single cell [12]. Also murine macrophages did not show reactions on NiTi-nanoparticles in viability assays. An increase of metabolic activity could have been an example for an immune reaction. As our data only give clues about in vitro effects of NiTi-nanoparticles, further experiments in vivo are necessary to ensure that particles do not induce negative reactions.

The influence of the uncoated control NiTi-sheets on the cells depends on the manufacturing processes. NiTi-sheets in this study



**Figure 6. Matrix secretion of osteogenic ASCs on NiTi.** SEM and violet laser scan of osteogenic ASCs revealed no visual differences in matrix secretion, whereas 3-d displays showed an enhanced morphology of cells and matrix on the coated parts of the sheets. A: SEM of half-coated NiTi-sheet (NiTi-nanoparticle coated part indicated by arrow, border indicated by dot line) with osteogenic ASCs; scale bar 500  $\mu\text{m}$ . B: violet laser surface scan (VK-9700, Keyence) of half-coated NiTi-sheet (NiTi-nanoparticle coated part indicated by arrow, border indicated by dot line) with osteogenic ASCs; scale bar 10  $\mu\text{m}$ . C: 3d-display of B, uncoated part. D: 3d-display of B, coated part.  
doi:10.1371/journal.pone.0053309.g006

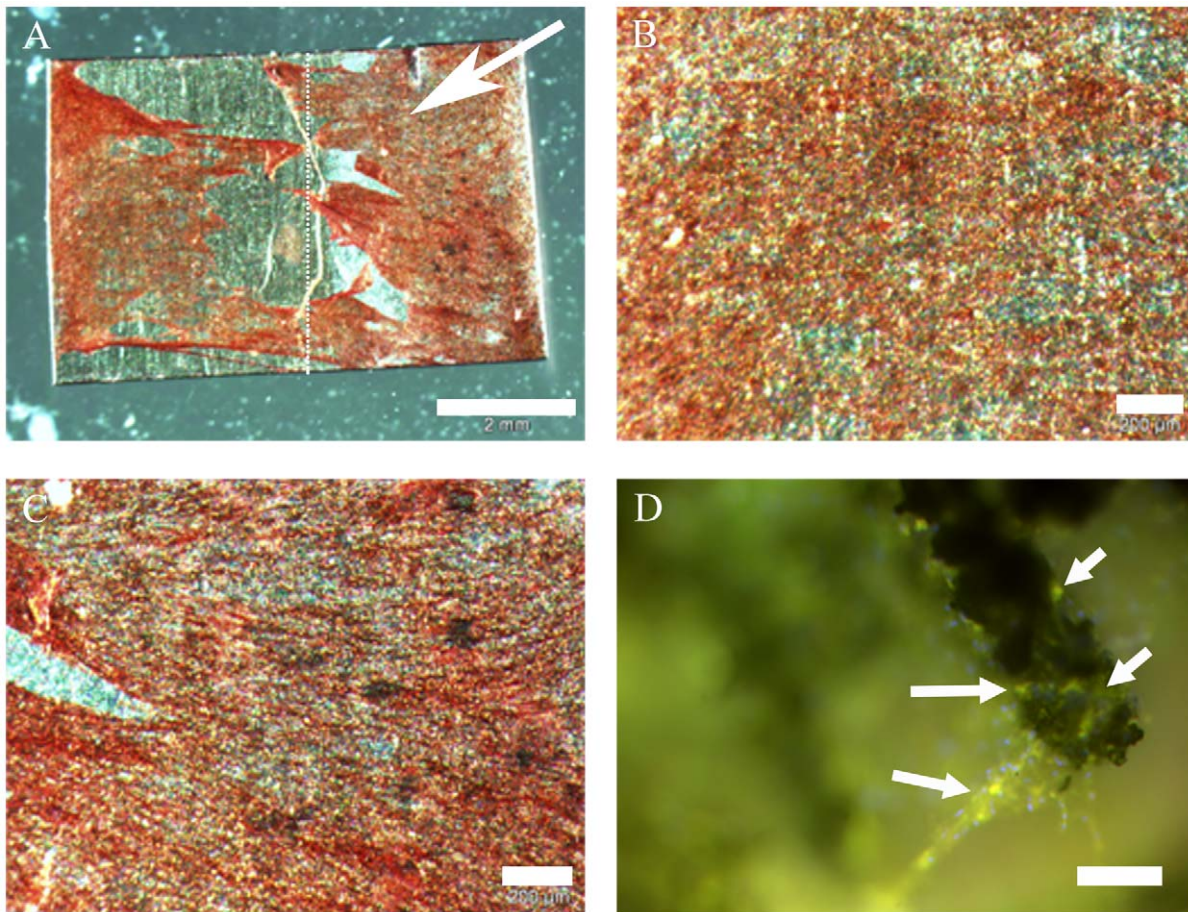


**Figure 7. Osteogenic ASCs on NiTi-nanocoated NiTi secrete fibronectin as part of the extracellular matrix.** blue: nuclei, green: fibronectin (indicated by arrows); scale bar 50  $\mu\text{m}$ .  
doi:10.1371/journal.pone.0053309.g007

were produced by rolling workpieces with 20 mm thickness. Surface finish was done by chemical etching, followed by rinsing steps with alcohol and water (manufacturer's information). Before application in cell culture sheets were autoclaved. According to the review of Shabalovskaya this treatments results in a better cytocompatibility, caused by a thicker oxide film (10–20 nm), a reduced Ni-surface concentration and a nearly negligible nickel release from the surface [24]. Based on this report, in our opinion the control NiTi-sheets used in our study allow an objective evaluation of benefits of the NiTi-nanoparticle coating. The question why more dead cells occurred on the uncoated sheets than on the coated ones after long time cultivation with osteogenic medium (Fig. 5) remained unclear, but we think that this might depend on chemo-physical properties of the surfaces.

Recent studies raised the question of potential allergic reaction of NiTi. Jeswani et al. discussed the use of NiTi implants for intracranial stents. Based on clinical data, they concluded that the usage of NiTi stents for patients with known nickel allergies has to be considered carefully [25]. An in vitro study of Habijan showed that probably only a subpopulation of patients with nickel allergies reacts sensitive to NiTi [26]. Concerning to this data the allergic potential of NiTi-nanoparticles needs to be evaluated in detail by further studies.





**Figure 8. ASCs on NiTi, verification of osteogenic differentiation by staining of calcium depositions and osteocalcin.** A: alizarin red staining, partly coated NiTi-sheet (coated part indicated by arrow, border indicated by dot line); scale bar 2 mm. B: detail of A, uncoated part; scale bar 200  $\mu\text{m}$ . C: detail of A, coated part; scale bar 200  $\mu\text{m}$ . D: NiTi-nanocoated structure with osteogenic ASCs; green: osteocalcin (indicated by arrows), blue: nuclei; scale bar 50  $\mu\text{m}$ .

doi:10.1371/journal.pone.0053309.g008

### Cell adherence

The presented study demonstrated that NiTi-nanoparticles allow an increase of adhered cells when used for nanostructuring of Nitinol or glass surfaces. We tested coatings up to 300  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  and noted increased numbers of adhered ASCs and an enhanced dimensional appearance. Muhonen et al. found differences in mouse osteoblast behavior on martensitic and austenitic NiTi, indicating that austenitic phase has better surface properties for cell adhesion. They discuss a lower hydrophobicity of austenite as a reason [27]. Accordingly, NiTi-nanoparticles decrease contact angles of the martensitic surface, which leads to a better wettability [12] and may cause the higher relative amounts of adhered ASCs.

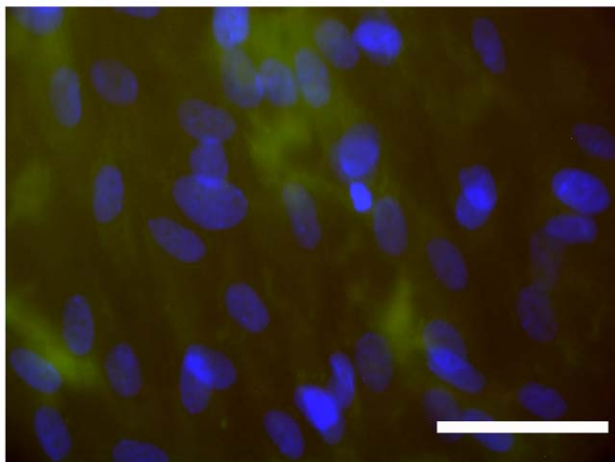
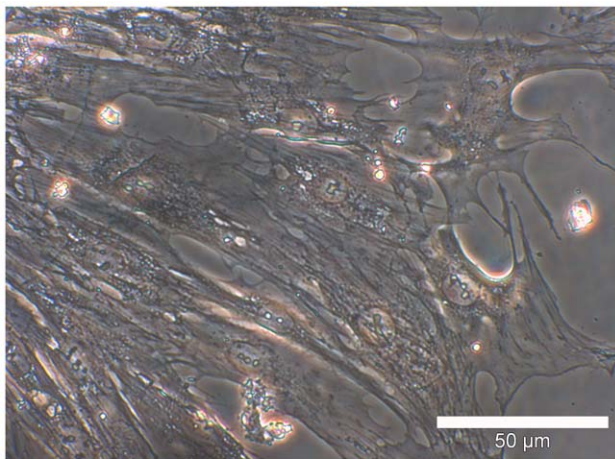
The findings of enhanced ASC densities on nanocoatings also correlate with findings of Palin et al. who tested nanoscale structurings of Ti- and poly-lactic-co-glycolic acid moulds. They found enhanced CRL-11372 (human osteoblast cell line) densities on nanoscaled surfaces [28]. The review of Tran and Webster describes several studies which came to the conclusion that nanoscaled surfaces increase adhesion and function of osteoblasts as bone is a naturally nano-structured tissue [1]. Taken together the NiTi-nanoparticle coating not only enhances the wettability of martensitic NiTi, but also may help to mimic the nanofeatures of bone and therefore enhances the surface attractivity for cells.

Identified integrin  $\alpha_5$ - and  $\beta_1$ -subunits as part of the adhesion of ASCs and osteogenic ASCs correlate with the knowledge about osteoblast adhesion on various substrates, where integrin  $\alpha_5$  and  $\beta_1$  play an important role for the differentiation of those cells [6]. ASCs may behave similar to MSCs, which were already shown to differentiate osteogenic on untreated NiTi [14,15]. Suitable to this type of integrin subunits we found high amounts of fibronectin (and thus the RGD-motif as ligand of integrin  $\alpha_5\beta_1$ ) – constituent part of the bone extracellular matrix – secreted by ASCs and osteogenic ASCs.

### Differentiation capacity

As ASCs showed enhanced relative adhesion rates and a dimensional growth it can be stated that the coating offers optimal conditions for the osteogenic differentiation of the cells. Honda et al. already demonstrated that three-dimensional growth promoted the differentiation of osteoblasts [29]. This group analyzed apatite-fiber scaffolds and demonstrated that the material itself also has an influence on the differentiation capacity of the cells. Of course the NiTi-nanoparticle coating has to be observed more in detail. According to Deligianni et al. who analyzed the influence of Ti-surface structure on human MSCs on osteogenic differentiation [30] we found good osteogenic differentiation of ASCs on Nitinol-nanostructures. Alizarin red stainings showed the typical calcium



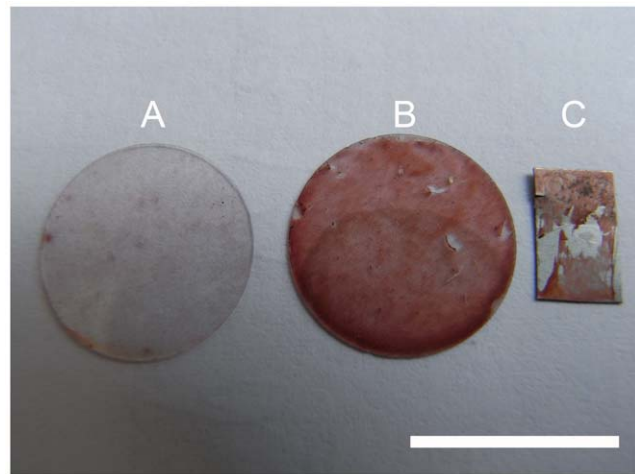


**Figure 9. ASCs on cover glasses, 6 weeks cultivation without osteogenic medium.** Alizarin red staining as well as immunofluorescence demonstrated that there did not occur osteogenesis or mineralization without osteogenic medium as the stainings were negative for the analyzed osteo markers. A: alizarin red staining; scale bar 50  $\mu\text{m}$ . B: red: osteopontin, green: fibronectin, blue: nuclei; scale bar 50  $\mu\text{m}$ .  
doi:10.1371/journal.pone.0053309.g009

depositions. Also the osteogenic markers osteocalcin and bone alkaline phosphatase were detected. As important part of the extracellular matrix fibronectin was present in osteogenic samples. The expression of integrin  $\alpha_5$ - and  $\beta_1$ -subunits was not visually changed by the nanocoatings, which also supports the conclusion that osteogenic differentiation capacity of ASCs is not changed by the adherence to nanoparticle coatings.

#### Further aspects

The presented study was performed under static conditions, future trials should be repeated under cyclic loading according to the experimental set-up of Habijan [15] simulating the conditions after transplantation. This might give detailed information about possible Ni ion or nanoparticle release from the implant and allows studying cell reactions. Habijan tested commercially available dense NiTi cylindrical rods and found MSCs to survive on those even though there were slightly increased Ni concentrations in the cell culture media resulting from cyclic loading. As the surface of our NiTi-nanoparticle coated NiTi is larger, Ni release might be higher.



**Figure 10. Macroscopic comparisons of alizarin red stainings.** Comparison of stainings demonstrated that calcium deposition occurred only under long time cultivation of ASCs with osteogenic medium (B and C), while cells on A were kept under same conditions without osteogenic medium. Scale bar 1 cm. A: ASCs on cover glass, cultivated for 6 weeks with medium. B: ASCs on cover glass, cultivated for 6 weeks with osteogenic medium. C: ASCs on NiTi-sheet, cultivated for 6 weeks with osteogenic medium.  
doi:10.1371/journal.pone.0053309.g010

In vitro analyses already evaluated the possible corrosion of Nitinol specimens caused by osteoclasts which are an important part of healthy bone. No evidence for corrosion was found [26]. Accordingly, possible interactions between NiTi nanoparticles and osteoclasts should be analyzed before the coating is going to be evaluated in vivo.

According to Shabalovskaya's review the popular spray plasma technique to modify NiTi surfaces applies thermal stress to the material and thus is not suitable for implants with a complex geometry [24]. The deposition of nanoparticles might be an alternative method for surface modification without thermal stress.

The enhanced relative adherence rates of cells on the nanocoating in comparison to the uncoated Nitinol-surface in early times of cultivation (first 48 hrs) could be used in two potential ways: first is use of the NiTi-nanocoating for NiTi-implants to attract stem cells surrounding the place of defect and to accelerate the osseointegration of an implant according to Bahat et al. [31]. Second is the use of NiTi-nanocoating and autogenic ASCs to get a faster implant ingrowth as the ASCs tend to differentiate osteogenic when implanted in a bony surrounding [32] and may recruit vessels as ASCs have a high angiogenic potential [33,34]. Furthermore, preseeding with autologous ASCs has another benefit: the co-transplantation of autologous material may decrease the probability of an inflammatory reaction. Several studies indicate mild immunosuppressive effects of ASCs in vitro and in vivo [35,36,37,38].

#### Conclusion

NiTi-nanoparticles up to a concentration to 300  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  do not induce or cause any negative influence on cell appearance, abnormal proliferation or cell death of ASCs. The relative amounts of adhered cells are higher on NiTi-nanoparticle coatings compared to the bare material. As the osteogenic differentiation on NiTi-surfaces is not inhibited or negatively influenced, the combination of ASCs with NiTi-nanocoatings on NiTi-implant material offers new ways in implantology research regarding

bioactivation by autologous stem cells and enhancement of surface attraction to cells, respectively.

## Acknowledgments

We wish to thank G. Preiss (Department for Cellular Biology, Hannover Medical School) for technical support regarding scanning electron microscopy and M. Fliess for support regarding the manuscript.

## References

- Tran N, Webster TJ (2009) Nanomaterials for bone materials. *Nanomed Nanobiotechnol* 1: 336–351.
- Shabalovskaya SA (1996) On nature of the biocompatibility and on medical applications of NiTi shape memory and superelastic alloys. *Bio-Med Mater Eng* 6: 267–89.
- Shabalovskaya SA (2001) Physicochemical and biological aspects of nitinol as a biomaterial. *Int Mater Rev* 46: 230–250.
- Blackwood DJ (2003) Biomaterials: past successes and future problems. *Corros Rev* 21: 97–124.
- Morgan NB (2004) Medical shape memory alloy applications – the market and its products. *Mater Sci Eng – Struct Mater Prop Microstruct Proc* 378: 16–23.
- Anselme K (2000) Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21: 667–681.
- Deligianni D, Katsala N, Ladas S, Sotiropoulou D, Amedee J et al. (2001) Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials* 22: 1241–1251.
- Palin E, Liu H, Webster T (2005) Mimicking the nanofeatures of bone increases bone-forming cell adhesion and proliferation. *Nanotechnology* 16: 1828–1835.
- Rachviandran R, Liao S, Ng C, Chan C, Raghunath M et al. (2009) Effects of nanotopography on stem cell phenotypes. *World J Stem Cells* 1: 55–66.
- Menendez-Manjon A, Jakobi J, Schwabe K, Krauss JK, Barcikowski S (2009) Mobility of nanoparticles generated by femtosecond laser ablation in liquids and its application to surface patterning. *JLMN-Journal of Laser Micro/Nanoengineering* 4: 95–99.
- Hahn A, Fuhlrott J, Loos A, Barcikowski S (2012) Cytotoxicity and ion release of alloy nanoparticles. *J Nanopart Res* 14: 686–696.
- Hahn A (2011) Lasergenerierte Nanomaterialien für Bioaktive Implantate. *Berichte aus dem Laserzentrum*. ISBN:978-3-943104-30-1.
- Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, et al. (1998) Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 16: 155–162.
- Köhl M, Habijan T, Bram M, Buchkremer HP, Stöver D (2009) Powder metallurgical near net shape fabrication of porous NiTi shape memory alloys for use as long-term implants by the combination of metal injection molding process with the space holder technique. *Adv Engineering Materials* 12: 959–968.
- Habijan T, Glogowski T, Kühn S, Wittsipe J, Greulich C, et al. (2011) Can human mesenchymal stem cells survive on a NiTi implant material subjected to cyclic loading? *Acta Biomaterialia* 7: 2733–2739.
- Kuhbier J, Weyand B, Sorg H, Radtke C, Vogt PM, et al. (2010) Stammzellen aus dem Fettgewebe. *Chirurg* 81: 826–832.
- Kuhbier JW, Weyand B, Radtke C, Vogt PM, Kasper C, et al. (2010) Isolation, Characterization, Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 123: 55–105.
- Zuk P, Zhu M, Ashjian P, De Urgate D, Huang J, et al. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the cell* 13: 4279–4295.
- Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, et al. (2005) Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue and umbilical chord blood. *Exp Hematology* 33: 1402–1416.
- Mizuno H (2009) Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch* 76: 56–66.
- Lendeckel S, Jödicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, et al. (2004) Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic clavial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg* 32: 370–373.
- Barcikowski S, Hahn A, Guggenheim M, Reimers K, Ostendorf A (2010) Biocompatibility of nanoactuators: stem cell growth on laser-generated nickel-titanium shape memory alloy nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research* 12: 1733–1742.
- Gebert A, Preiss G (1998) A simple method for the acquisition of high-quality digital images from analog scanning electron microscopes. *Journal of microscopy* 91;3: 297–302.
- Shabalovskaya SA, Anderegg J, Van Humbeeck J (2008) Critical overview of Nitinol surfaces and their modifications for medical applications. *Acta Biomaterialia* 4: 447–467.
- Jeswani S, Alexander MJ (2011) Nickel allergy: a reason for concern? *J NeuroInterventSurg* 3: 2–4.
- Habijan T (2009) Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen auf Nickel-Titan-Formgedächtnislegierungen. *Dissertation, Ruhr-Universität Bochum*
- Muhonen V, Fauveaux C, Olivera G, Vigneron P, Danilov A, et al. (2009) Fibronectin modulates osteoblast behavior on Nitinol. *J Biomed Mater Res 88A*: 787–796.
- Palin E, Liu H, Webster T (2005) Mimicking the nanofeatures of bone increases bone-forming cell adhesion and proliferation. *Nanotechnology* 16: 1828–1835.
- Honda M, Fujimi TJ, Izumi S, Izawa K, Aizawa M, et al. (2010) Topographical analyses of proliferation and differentiation of osteoblasts in micro- and macropores of apatite-fiber scaffold. *J Biomed Mater Res 94A*: 937–944.
- Deligianni D, Katsala N, Ladas S, Sotiropoulou D, Amedee J, et al. (2001) Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials* 22: 1241–1251.
- Bahat O, Sullivan RM (2010) Parameters for successful implant integration revisited part I: immediate loading in light of the original prerequisites for osseointegration. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 12: 1: 2–12.
- Lu ZF, Roohani-Esfahani SI, Wang G, Zreiqat H (2012) Bone biomimetic microenvironment induces osteogenic differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Nanomedicine* 8: 507–515.
- Wang M, Crisostomo P, Herring C, Meldrum K, Meldrum D (2006) Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: 880–884.
- Schäffler A, Büchler C (2007) Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells—Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. *Stem Cells* 25: 818–827.
- Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, et al. (2005) Immunomodulatory effect of human adipose tissue derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 129: 118–129.
- Kang JW, Kang KS, Koo HC, Park JR, Choi EW, et al. (2008) Soluble factors-mediated immunomodulatory effects of canine adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 17: 681–693.
- Keyser KA, Beagles KE, Kiem HP, (2007) Comparison of mesenchymal stem cells from different tissues to suppress T-cell activation. *Cell Transplant* 16: 555–562.
- Yanez R, Lamana ML, Garcia-Castro J, Colmenero I, Ramirez M, et al. (2006) Adipose tissue derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* 24: 2582–2591.

## Author Contributions

Fabricated the nanoparticles: AN. Coated scaffolds: AN. Conceived and designed the experiments: SS SB KR. Performed the experiments: SS. Analyzed the data: SS KR PV. Contributed reagents/materials/analysis tools: AN SB DK JK CR KR PV. Wrote the paper: SS KR.

## **Diskussion**

*SLM-NiTi und NiTi-Nanopartikel haben keine toxischen Effekte auf ASCs und murine Makrophagen*

Weder Vitalitätsnachweise wie zum Beispiel life/dead Tests, noch Messungen der Stoffwechselaktivität erbrachten Hinweise auf Beeinträchtigungen der Zellen durch toxische Wirkungen. Auch nach 6 Wochen Kultivierungszeit zeigten sich die ASCs auf allen Oberflächen vital. Die relativen Anteile lebender und toter Zellen auf NiTi-Feinblechen, SLM-NiTi und Nanobeschichtungen zeigten sich durchweg vergleichbar zu Glas.

Für life/dead Tests wurden die Zellen auf SLM-Strukturen, so wie beschichteten und unbeschichteten Deckgläsern und Feinblechen kultiviert. Nach 48 Stunden oder einer Woche wurde die Vitalität durch Anfärben mit Calcein bzw. Ethidium-Homodimer-1 analysiert. Calcein färbt vitale Zellen grün-fluoreszent, während Ethidium-Homodimer-1 tote Zellen rot-fluoreszent erscheinen lässt. Der gleiche Test wurde auch nach 6 Wochen osteogener Differenzierung durchgeführt. Die Stoffwechselaktivität wurde zusätzlich zu beschichteten und unbeschichteten Blechen an Nanopartikel-Colloiden nach einer Stimulationszeit von 48 Stunden ausgetestet. Dazu wurden die Colloide mit einer finalen Nanopartikel-Konzentration von 2 µg/ml zum Zellkulturmedium gegeben und für 48 Stunden mit den Zellen inkubiert. Damit sollte der Einfluss der Partikel bei einer potenziellen Ablösung vom Implantat untersucht werden. Zur Messung des Einflusses eines Direktkontaktes der Zellen mit den Feinblechen erfolgte durch Besiedlung mit Zellen und anschließender 48 stündiger Kultivierung der Zellen auf den Oberflächen. Alle Analysen zeigten im mikroskopischen Bild hohe relative Anteile lebender Zellen und auch die Auswertung zeigte keine signifikanten Einflüsse der Materialform, so dass sich keine Auswirkungen von NiTi in allen experimentellen Darreichungsformen auf die untersuchten Zellen zeigten. Einzig in der Kontrollgruppe, die mit 10% DMSO stimuliert wurde, konnte eine signifikante Reduktion nachgewiesen werden. DMSO führte in der eingesetzten Konzentration zum Absterben der Zellen, folglich verringerte sich die gemessene Stoffwechselaktivität.

Um erste Hinweise auf mögliche Immunreaktionen zu erhalten, wurde zusätzlich der Einfluss von NiTi auf murine Makrophagen untersucht. Eine Erhöhung der Stoffwechselaktivität (also eine Aktivierung der Zellen) wurde jedoch nicht beobachtet, ebenso wenig ein Absinken der Aktivität als Hinweis auf ein Absterben der Zellen. Auch bei den Makrophagen konnte nur durch Zugabe von 10% DMSO eine signifikante Regulation der Stoffwechselaktivität gemessen werden. Diese Ergebnisse korrespondieren mit Untersuchungen zur potenziellen Zytotoxizität von NiTi-Nanopartikeln von Hahn et al. Erst sehr hohe Konzentrationen von Colloiden von über 100  $\mu\text{M}$  entwickelten eine toxische Wirkung auf humane koronar-arterielle Endothel- (hCAEC) und –Muskelzellen (hCASMC), so wie humanen Osteoblasten (Hahn 2012). Zum Erreichen dieser Konzentrationen wäre aber rein rechnerisch die Ablösung der 6fachen Menge an Nanopartikeln notwendig, die als Monolayer Beschichtung auf die Fläche passen, die von einer ASC bedeckt werden können (Hahn 2011).

In einem Punkt differieren die Ergebnisse jedoch: Hahn et al. beobachteten eine Abhängigkeit der toxischen Wirkung von NiTi-Nanopartikeln im Zusammenhang mit den eingesetzten Additiven. Die drei obengenannten Zelltypen zeigten sich sensibler bei der Kombination von Nanopartikeln mit Cystein, während mit Citrat versetzte Colloide in vergleichbarer Konzentration keine Schäden hervorriefen (Hahn 2011, Hahn 2012). Im Gegensatz dazu wiesen weder ASCs noch murine Makrophagen bei den Stoffwechselaktivitätsmessungen signifikante Unterschiede zwischen den genannten Additiven auf. Auch die life/dead- und Immunfluoreszenz-Analysen nanobeschichteter Deckgläser lieferten keine Hinweise auf unterschiedliche zelluläre Reaktionen (Sekretion von Fibronectin, Ausbildung von Fokaladhäsionen, Morphologie des Cytoskeletts).

#### *Eignung des verwendeten unbeschichteten NiTi-Feinblechs als Kontrollmaterial*

Nach einer Studie von Shabalovskaya beeinflusst die Herstellung des Materials erheblich dessen Biokompatibilität. Je nach Verarbeitungstechnik und/oder Nachbearbeitung des Materials entstehen unterschiedliche Oberflächenrauigkeiten und passivierende Oxidschichten. Hierdurch wird die Nickel-Freisetzung beeinflusst.

Diese Tatsache findet jedoch in den meisten Materialstudien keine Beachtung (Shabalovskaya 2008).

Nach Aussage des Herstellers (Memory-Metalle GmbH, Weil am Rhein, Deutschland) der in dieser Arbeit verwendeten NiTi-Feinbleche (Alloy M, martensitischer Zustand) wurden diese durch Walzen eines 2 mm starken Grobblechs hergestellt. Die Feinbleche wurden in einem Tauchbad geätzt und anschließend in Alkohol und Wasser gewaschen. Vor Verwendung in der Zellkultur wurden die Bleche im Labor autoklaviert (121°C, 20 min). Laut Hersteller nimmt der Autoklaviervorgang keinen weiteren Einfluss auf die Materialbeschaffenheit. Erst Hitzeeinwirkung über mehrere Stunden (bei 121°C) oder höhere Temperaturen sollen laut Hersteller zu Veränderungen führen.

Ausgehend von der Arbeit von Shabalovskaya weist auf diese Art hergestelltes NiTi eine gute Biokompatibilität auf, da die Legierung mit einer relativ dicken Oxidschicht (10 – 20 nm) bedeckt ist. Die Nickelfreisetzung ist vernachlässigbar gering (Shabalovskaya 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte die postulierte gute Biokompatibilität durch life/dead Tests und Messungen der Stoffwechselaktivität der Zielzellen bestätigt werden.

Das verwendete unbeschichtete NiTi-Feinblech ermöglicht damit zuverlässige Aussagen über die Einflüsse der untersuchten SLM- und Nanomaterialien.

#### *ASCs adhärieren und proliferieren auf NiTi und NiTi-Nanopartikelbeschichtungen*

Von MSCs ist bereits bekannt, dass sie auf glattem und porösem NiTi adhärieren (Köhl 2009, Habijan 2011). Mit der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden ob auch ASCs (die unter wesentlich geringerem Aufwand vom Patienten zu isolieren sind) auf NiTi mit verschiedenen Oberflächen-Rauhigkeiten adhärieren und proliferieren. Dazu wurden Feinbleche (minimal strukturierte Oberfläche), SLM- (Mikrostrukturierung) und Nanopartikel-beschichtete (Nanostrukturierung) NiTi-Oberflächen mit ASCs besiedelt und diese anschließend (elektronen-) mikroskopisch analysiert. Die Morphologie der ASCs auf NiTi-Feinblechen war vergleichbar mit derer auf unbehandeltem Glas und Zellkulturplastik. Die Zellen erschienen im elektronenmikroskopischen Bild stark abgeflacht. Auf den rauen SLM- und den

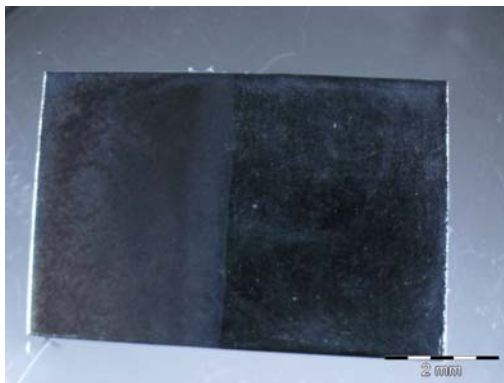
Nanooberflächen zeigten ASCs eine deutlich 3-dimensionalere Morphologie und höhere Zelldichte.

Die Beobachtungen auf den SLM-Oberflächen decken sich mit einer Studie von Hollander et al., die sich mit einer SLM-Titan-Legierung (TiAl6V4) und primären menschlichen Osteoblasten-ähnlichen Zellen beschäftigt (Hollander 2003). Die Osteoblasten-ähnlichen Zellen wiesen auf den SLM-Oberflächen eine ausgeprägtere Morphologie auf. Des Weiteren zeigte die Arbeitsgruppe, dass die Zelldichte auf den SLM-Trägern im Vergleich zu flachen Oberflächen deutlich erhöht war. Gründe für die hohen Adhäsionsraten auf den SLM-Oberflächen könnten nach einer Studie von Deliginanni et al. in einer verstärkten Bindung von Serumproteinen an raue Oberflächen liegen, die den Zellen wichtige Wachstumsfaktoren und Nahrung bieten (Deliginanni 2001).

Die Beschichtung der NiTi-Feinbleche mit NiTi-Nanopartikeln erbrachte im direkten Vergleich zu unbeschichteten Blechen erhöhte ASC-Adhäsionsraten, sowie ebenfalls eine 3-dimensionalere Zellmorphologie. Hierbei wurden halbseitig beschichtete NiTi-Bleche verwendet (Abb. 8). So konnte auf einfachem Wege analysiert werden auf welchem Oberflächentyp mehr Zellen adhärten. In den ersten 24 bis 48 h der Kultivierung wurden die beschichteten Oberflächen stärker von den Zellen besiedelt. Ein Grund dafür kann die Veränderung der Oberflächeneigenschaften durch Nanopartikel sein. Analysen von Hahn ergaben eine leichte Erhöhung der Hydrophilie (Hahn 2011). Diese ermöglicht den Zellen eine leichte Anheftung. Zudem ist auch hier eine Bindung von Serumproteinen aus dem Medium, angelehnt an die Beobachtungen von Deliginanni et al., denkbar (Deliginanni 2001). Die Ergebnisse korrespondieren darüber hinaus mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen bezüglich der positiven Auswirkungen von Nanostrukturierungen der Oberflächen auf Knochenzellen und deren Adhäsion (Anselme 2000, Palin 2005, Rachviandran 2009). Unterschiede zwischen starker ( $300 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) oder nur leichter Beschichtung ( $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) waren nicht nachweisbar, so dass hier davon ausgegangen werden kann, dass es sich nicht um ein Dosis-Wirkprinzip handelt, sondern lediglich die Strukturveränderungen der Oberfläche für den beobachteten Effekt verantwortlich sind und die ausgetesteten Konzentrationen alle innerhalb des Wirkungsspektrums lagen. Eine Überprüfung weiterer Konzentrationen würde wahrscheinlich eine Effektivitäts-ober- und untergrenze definieren. Die Untergrenze könnte ein

Nichterreichen der notwendigen Rauigkeit durch Aufbringen zu weniger Teilchen bilden. Eine zu hohe Partikeldichte würde eventuell eine Pseudoglätte erzeugen. Hierzu sind jedoch noch weitere Experimente erforderlich.

Auch bei längerer Kultivierungszeit von ASCs auf halbseitig beschichtetem NiTi waren trotz sich einstellender Zellkonfluenz Unterschiede in der Zelldichte zu beobachten. Die Zellen im beschichteten Abschnitt wirkten deutlich dichter und wiesen die ASCs typische wirbelartige Anordnung auf.



*Abbildung 8 NiTi-Blech mit halbseitiger Nanopartikel- Beschichtung (rechte Seite)*

Die Ergebnisse der immunocytochemischen Analysen stützen die oben beschriebenen Beobachtungen. Die Zellen auf SLM-NiTi bzw. den Nanopartikeln sezernierten Fibronectin und bildeten Fokaladhäsionen, die durch die Integrine  $\alpha_5$  and  $\beta_1$  vermittelt werden. Das daran verankerte Actin-Cytoskelett, so wie die Tubulin-Struktur zeigte sich homogen. Das Erscheinungsbild war damit vergleichbar zu Kontrollen auf Glas und NiTi-Blechen. Die Vermittlung der Adhäsion von ASCs gleicht damit derer von Osteoblasten auf verschiedenen Substraten (Anselme 2000). Die Matrix-Integrin-Cytoskelett-Verbindung ist auch bei ASCs essenziell für die Transduktion mechanischer Reize, die die osteogene Differenzierung vermitteln (Bodde 2011).

### *Erfolgreiche Besiedlung 3-dimensionaler SLM-Strukturen*

Da ASCs auf den getesteten Oberflächen eine gute Adhäsion zeigten und keine toxischen Wirkungen der Materialformen nachgewiesen wurden, sollte als nächster Schritt die Besiedlung 3-dimensionaler SLM Strukturen mit ASCs untersucht werden. Mikroskopische Analysen zeigten, dass die Zellen sowohl außen auf den Strukturen als auch in die 3-dimensional aufgebauten SLM-Strukturen hinein wuchsen. Die relativen Anteile lebender ASCs waren außen und innen sehr hoch.

Die Analyse 3-dimensionaler Probenkörper erfordert eine Anpassung der Mikroskopietechniken. Mit den üblichen Mikroskopen können nur punktuell scharfe Bilder erzeugt werden. Bessere Ergebnisse können mit entsprechender 3d-Mikroskopie erzielt werden.

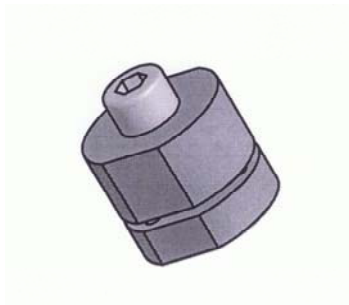
Die Zellvitalität im life/dead Test zeigte sich in allen Experimenten vergleichbar zur Studie von Lee et al. mit murinen Osteoblastenvorläuferzellen und Polypropylenfumarat-Strukturen. Die Arbeitsgruppe fand hohe Anzahlen lebender Zellen auf und in Strukturen mit untereinander verbundenen Poren. Die Porengröße betrug dabei um 300 µm. Strukturen, die mit Spaceholder Technik erzeugt wurden, zeigten signifikant geringere Zellvitalität und weniger tiefe Besiedlung des Inneren (Lee 2010). Die gewählte Strukturierung innerhalb der NiTi-Probenkörper erlaubte also nicht nur die Migration der ASCs ins Innere, sondern auch deren Versorgung durch Diffusionsvorgänge, die für das Überleben von Zellen und Geweben ohne Gefäßversorgung, überlebenswichtig sind (Folkmann 1975). Aus Kostengründen und zur Vereinfachung der Analysen wurden bisher nur kleine SLM-Strukturen getestet. Weitergehende Studien mit größeren Strukturen werden zeigen, ob die gewählte Porengröße noch weiter optimiert und an die Dimensionierung angepasst werden muss.

### *Mechanische Induktion der osteogenen Differenzierung von ASCs*

Die osteogene Differenzierung der ASCs auf NiTi-Oberflächen konnte sowohl auf chemischem wie auch auf mechanischem Weg induziert werden. Bisher wurde die mechanische Induktion nur im Bioreaktor unter zusätzlicher chemischer Stimulation vorgenommen (Bodle 2011, Mischen 2008, Tjabringa 2006, van Griensven 2009). Die



vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass eine mechanische Differenzierung ohne weitere chemische Stimulation und zudem außerhalb des geschlossenen Reaktionsraums eines Bioreaktors möglich ist. Da zum Zeitpunkt der Experimente eine Induktion des Formgedächtniseffekts bei den SLM-Strukturen noch nicht in einer zellphysiologischen Temperaturspanne möglich war (siehe Einleitung, Einfluss der Prozessparameter), musste der Effekt durch externe Kompression simuliert werden. Dazu wurden die Strukturen in selbstentwickelte Klemmen (Abb. 9) eingesetzt und mit einer definierten Kraft verspannt. Der applizierte mechanische Stress führte zu einer osteogenen Differenzierung der ASCs. Die immunzytologischen Analysen und bildgebenden Verfahren zeigten keine Unterschiede zwischen chemisch und mechanisch induzierter Differenzierung. Bei beiden Prozessen wurden verschiedene Knochenmarker detektiert.



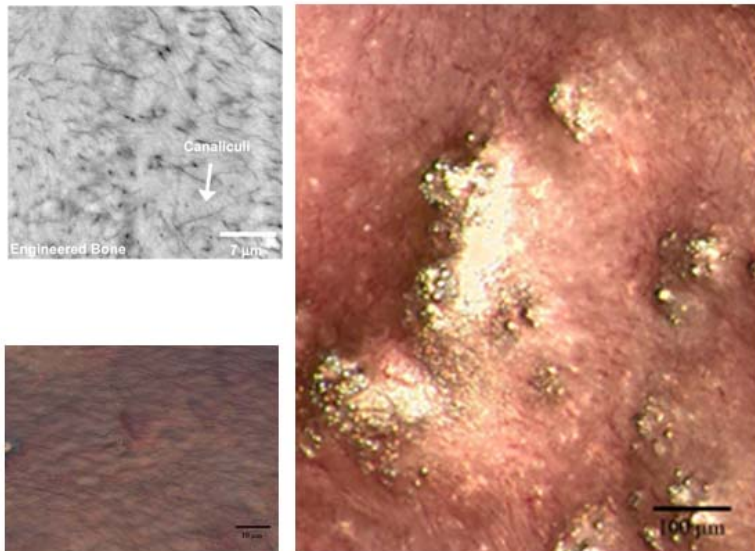
*Abbildung 9 Titan-Klemme zur Kompression der NiTi-Strukturen*

Sowohl bei chemisch wie auch mechanisch differenzierten ASCs wurden Osteocalcin, SPARC, Osteopontin, BMP-2, BMP-6 und Bone Alkaline Phosphatase gefunden. Darüber hinaus enthielt die extrazelluläre Matrix (ECM) Fibronectin und Collagen I. Die detektierten Marker korrespondieren mit den Expressionsmustern die ursprünglich Malaval et al für die *in vitro* Osteogenese aus MSCs der Ratte beschrieben haben (Malaval 1994) und die ebenfalls von Zuk et al. in ihrer grundlegenden Arbeit zur osteogenen Differenzierbarkeit von ASCs im direkten Vergleich mit MSCs genannt werden (Zuk 2002).

In der klassischen histologischen Analyse mittels Alizarin red Färbungen wurden knochentypische Calcium-Ablagerungen angefärbt. Auch hier ergab sich kein visueller Unterschied zwischen den Differenzierungstechniken.

Neben den typischen homogenen Anfärbungen wurden im digital-mikroskopischen Bild tubuläre Substrukturen beobachtet. Diese erinnern bezüglich ihrer Anordnung und Struktur an ossäre Canaliculi, die Pelled et al. beschrieben haben (Abb.10). Die Arbeitsgruppe untersuchte die Substrukturen in vitro gezüchteten Knochens aus genetisch manipulierten MSCs. Zur osteogenen Induktion wurde hier BMP-2 mittels eines Vectors in den Zellen überexprimiert. Mit Hilfe eines Polylactidträgers wurden die MSCs dann unter die Haut von Mäusen implantiert. Nach vier Wochen wurden mittels bildgebender Verfahren in den osteogenen Zellen Canaliculi nachgewiesen (Pelled 2007). Im nativen Knochen werden die Canaliculi von den Osteocyten gebildet (Kusuzaki 2000). Die Canaliculi bilden zusammen mit den Lacunae das lacuno-caniculare System, welches perizelluläre Flüssigkeit enthält. Die Funktionen dieses mikrozirkulatorischen Systems sind vielfältig. Sie umfassen die Versorgung der Knochenzellen mit Nährstoffen und Sauerstoff, den Abtransport von Metabolismusprodukten, die zelluläre Kommunikation so wie die Rezeption und Transduktion mechanischer Reize (Knothe Tate 2003).

Ein sicherer Nachweis von Canaliculi in in vitro gezüchtetem Knochengewebe ist, auf Grund ihrer mangelnden Beschreibung, schwierig. Für nativen Knochen nennt Knothe Tate zwar Aldolase und Transferrin als mögliche Tracer (Knothe Tate 2003), bisher existiert jedoch keine Studie, die in vitro Marker für die Strukturen beschreibt.



*Abbildung 10 links oben: Canaliculi in tissue-engineertem Knochengewebe (Pelled 2007)*

*Rechts und links unten: osteogen differenzierte ASCs, Alizarin red Färbung mit Substrukturen in dunkel rot.*

### *Implantatdesign*

Insgesamt scheint das gewählte Implantatdesign für eine prätransplantative Bioaktivierung durch Besiedlung mit ASCs gut geeignet. Die Zellen wuchsen sowohl außen als auch im Inneren der käfigartigen Strukturen. Sie zeigten sich zu jedem analysiertem Zeitpunkt vital. Nach osteogener Differenzierung wurden die entsprechenden Marker auch von Zellen im Inneren exprimiert. Dies lässt den Schluss zu, dass die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen adäquat ist und der applizierte mechanische Stress im gesamten Implantat zu einer osteogenen Differenzierung führt. Hiermit sind essenzielle Anforderungen an das Implantat erfüllt. Allerdings ist hier zu bedenken, dass das Überleben von Zellen in bzw. auf bioaktivierten Implantaten (wie auch das von Geweben ohne Gefäßanschluss) von Diffusionsvorgängen abhängig ist, die auf wenige Millimeter begrenzt sind (Folkmann 1973). Hier ist zur Verbesserung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung eine kontrollierte Implantatstrukturierung hilfreich, da poröse Strukturen mit zufällig angeordneten Poren signifikant geringere Anteile vitaler Zellen und eine geringe Einwachstiefe zeigen (Lee 2010).

Langfristig besteht beim gewählten Implantatdesign die Möglichkeit des Einsprossens neuer Blutgefäße zur Versorgung des gebildeten Knochengewebes. Unger et al.

zeigten *in vitro*, dass die Co-Kultivierung menschlicher Osteoblasten und Endothelzellen auf porösem NiTi zur Ausbildung eines Mikrokapillar-ähnlichen Netzwerks führt (Unger 2007). Auch ohne prätransplantative Besiedlung konnte an porösem NiTi das Einsprossen neuer Blutgefäße innerhalb eines Jahres im Schafmodell nachgewiesen werden (Assad 2003). Da ASCs von Natur aus VEGF synthetisieren (Wang 2006, Schäffler 2007) ist es denkbar, dass eine zusätzliche Versorgung des Implantates mit angiogenetischen Faktoren zur raschen Rekrutierung neuer Blutgefäße nicht notwendig ist. Die evaluierte NiTi-Nanobeschichtung bietet eine Alternative zur bisher favorisierten Plasma-Spray-Technik zur Oberflächenmodifikation von NiTi. Laut Shabalovskaya ist der thermale Stress, der bei der Plasma-Spray Beschichtung auf das NiTi ausgeübt wird, für komplexe Geometrien ungeeignet, da die grundlegenden Materialeigenschaften verändert werden und dies die Biokompatibilität negativ beeinflussen kann (Shabalovskaya 2008). Die elektrophoretische Abscheidung, so wie das Dip-Coaten dagegen arbeiten ohne thermischen Einfluss und sind damit für komplexe Geometrien ohne Beeinflussung der Materialeigenschaften besser geeignet.

## **Ausblick**

### *Implantat vermittelter mechanischer Stress zur osteogenen Differenzierung*

Kürzlich gelang durch Optimierung des Herstellungsverfahrens der NiTi-Legierung (Eigenherstellung durch das Laserzentrum Hannover e.V. in Kooperation mit dem NiTi-SFB der Ruhruniversität Bochum) und der Veränderung der SLM-Prozessparameter die Einstellung einer Phasenumwandlungstemperatur im physiologischen Bereich (Dudziak 2012), so dass in Zukunft die osteogene Differenzierung direkt über das Implantat induziert werden kann. Mittels in vitro Versuchen muss als nächster Schritt ermittelt werden, welche Dimensionen der Formgedächtniseffekt haben muss, um eine ausreichende Stimulation der ASCs zu gewährleisten. Durch die Klemmen wurde eine errechnete Kraft bis zu  $1568 \text{ N/mm}^2$  (siehe Abschnitt „Calculation of applied pressure“, im Fachartikel „Induction of osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells by microstructured Nitinol actuator-mediated mechanical stress“) auf die SLM-Strukturen ausgeübt. Die gleiche Kraft müsste das Implantat mittels Formveränderung nach Induktion des FG-Effekts auch auf die Zellen ausüben. Da bisher nur mit groben Näherungen gerechnet werden konnte (die Kraftübertragung von der Klemme auf die Strukturen hängt von vielen Faktoren wie Reibung, Oberflächenrauheit, Feuchtigkeit etc. von Schraube und Gewinde, Innenaufbau der Strukturen) ab, werden vermutlich mehrere experimentelle Ansätze notwendig sein, um die optimale Formveränderung eingrenzen zu können.

### *In vivo Handhabung der SLM-Strukturen*

Ausgehend von den vorliegenden in vitro Analysen mit SLM-NiTi und ASCs, sollte bei einer in vivo Testung der Strukturen die Transplantation 24 bis 48 h nach Aufsiedlung der Zellen erfolgen, da sonst die Gitterstrukturen bereits vollständig überwuchert sind und so das Einsprossen von Blutgefäßen behindert werden könnte. Auch kommt eine Sterilisation mittels Autoklavieren oder anderer Verfahren, welche mit Erhitzen arbeiten, nicht in Frage, da bei diesem Vorgang die Phasenumwandlungstemperatur überschritten und der FG-Effekt damit schon vor Aufsiedlung der Zellen induziert würde. Mögliche Alternativen könnten die Gamma-Sterilisation oder die Ethylenoxid-Begasung sein.

### *Veränderungen durch zyklische Belastungen in vitro*

Sowohl NiTi-SLM-Oberflächen als auch Nanopartikelbeschichtungen verschiedener Konzentrationen wurden bisher nur in statischer Kultur untersucht. Ausgehend von einem Testmodell von Habijan et al. (Habijan 2009b) sollten jedoch auch Untersuchungen an Oberflächen unter zyklischer Belastung durchgeführt werden, da diese der Situation nach Implantation näher kommen. In seinen Untersuchungen an NiTi fand Habijan unter anderem eine erhöhte Freisetzung von Nickel Ionen aus NiTi unter zyklischer Belastung. Diese zeigte jedoch keine Auswirkung auf aufgesiedelte MSCs.

### *Allergisches Potenzial*

Es wird zunehmend kontrovers diskutiert, welche Auswirkungen die aus NiTi freigesetzten Nickel Ionen auf Allergiker haben könnten. Jeswani et al. raten bei intracranialen Stents zur Vorsicht, wenn der Patient Nickelallergiker ist (Jeswani 2011). Habijan zeigte, dass in vitro bei einer Subpopulation der Nickelallergiker Reaktionen auf NiTi auftreten. T-Zellen dieser Nickel-Allergiker Gruppe reagierten auf Zugabe NiTi-konditionierten Zellkulturmediums mit der Freisetzung von Interleukin-5 und Interleukin-13, während die Zellen anderer Nickel-Allergiker wie die von Nichtallergikern keine Reaktion zeigten (Habijan 2009a). Es ist möglich, dass SLM-NiTi bzw. NiTi-Nanobeschichtungen durch ihre im Vergleich größere Oberfläche mehr Nickel freisetzen, als die von Habijan verwendeten NiTi-Stäbe. Daher sollte vor der klinischen Testung unbedingt eine Abklärung des allergischen Potenzials von SLM-NiTi und NiTi-Nanopartikeln angelehnt an den Versuchsaufbau von Habijan (2009a) in vitro erfolgen. Nagermodelle gelten bisher zur Evaluation allergischer Reaktionen auf Nickel als ungeeignet, da eine Induktion nur über die humane Variante des Toll-like Rezeptors 4 (TLR-4) funktioniert (Schmidt 2010). Die Ausnahme bildet ein von Schmidt et al. generierter Mausstamm, bei dem der murine TLR-4 durch die humane Variante des Rezeptors ersetzt wurde (Schmidt 2010).



### *Ausschluss einer Biokorrosion von NiTi*

In der vorliegenden Arbeit wurden ASCs bzw. osteogen differenzierte ASCs auf Nanopartikelbeschichtungen untersucht. Zu einem gesunden Knochengewebe gehören jedoch weit mehr Zelltypen. So migrieren z.B. Osteoklasten über die Knochenoberfläche und resorbieren diese. Die Resorption mineralischer Komponenten wird durch eine Herabsetzung des pH-Werts zwischen Osteoklast und Oberfläche ermöglicht (Baron 1985). Diese Prozesse laufen während der Einheilung eines Implantats weiter ab. Es ist also davon auszugehen, dass auch Osteoklasten in Kontakt mit der Implantatoberfläche kommen. Im schlimmsten Fall könnte dies zu einer Freisetzung von Nickel führen.

Die Hypothese von Heintz et al. einer von aktivierten Makrophagen (eng verwandt mit Osteoklasten) verursachten Lochkorrosion, die an explantierten NiTi-Stents beobachtet wurde (Heintz 2001), konnte bisher nicht experimentell bestätigt werden; so erbrachten in vitro Untersuchungen von Habijan keinerlei Hinweise auf Biokorrosion von NiTi durch Osteoklasten (Habijan 2009). Es muss aber berücksichtigt werden, dass bisher nur glatte NiTi-Oberflächen analysiert wurden. Nanopartikel weisen möglicherweise bedingt durch ihre geringe Größe andere chemisch-physikalische Eigenschaften auf und könnten so durch Osteoklasten einfacher korrodiert werden. Es sollte daher ein Ausschluss von Biokorrosion Nanopartikel-beschichteter NiTi-Oberflächen durch Osteoklasten mittels entsprechender Analysen erfolgen und die etwaige Freisetzung von Nickel untersucht werden. Neben der Biokorrosion könnten Nanopartikel auch durch Belastung des Implantates freigesetzt werden. In der statischen Kultur war auch nach Langzeitbesiedlung keine Ablösung der Partikel zu beobachten, jedoch wurden nur bildgebenden Verfahren zur Analyse verwendet. Es sollten weitergehende Untersuchungen mit verfeinerten Messmethoden erfolgen, um eine Freisetzung von Nanopartikeln ausschließen zu können.

### *Rechtliche Rahmenbedingungen*

Der behandelnde Arzt müsste bei Verwendung des entwickelten Hybridimplantats wichtige Eckpunkte berücksichtigen, die durch die Richtlinien 2006/17/EC und 2006/86/EC der europäischen Kommission festgelegt wurden. Diese regeln eigentlich

den Umgang mit autologen Gewebe- und Zellspenden, umfassen jedoch auch die Gewinnung, Verarbeitung, Lagerung und Transplantation autologer Zellen und Gewebe, wenn diese nicht innerhalb der gleichen Operation weiterverwendet werden. In Deutschland wurden die Richtlinien in Form des sog. Gewebegesetzes (GewebeG) umgesetzt. Genau genommen handelt es sich dabei um ein „Gesetzes-Änderungsgesetz“. Bestehende Rechtsvorschriften des Transplantations- (TPG), Arzneimittel- (AMG) und Transfusionsgesetzes (TFG), sowie die Apotheken- und Arzneimittelgroßhandelsbetriebsverordnung wurden damit an die europäischen Vorgaben angepasst.

Laut deutschem Gewebegesetz gelten die isolierten ASCs als Arzneimittel, der Chirurg wird damit zum Hersteller (§4a AMG). Dafür benötigt er eine Lizenz (§20b und c AMG), die bei der zuständigen Landesbehörde zu beantragen ist. Die weitere Aufarbeitung der ASCs und die anschließende Besiedlung der Implantate darf nur in dafür zertifizierten Einrichtungen (im TPG als Gewebereinrichtung bezeichnet) durchgeführt werden (§20c AMG). Die Transplantation des bioaktivierten Implantates ist ebenfalls vom Gewebegesetz betroffen. Hier besteht eine 30 jährige Aufbewahrungspflicht der Daten (§13a Abs. 5, TPG).

Die derzeitige Gesetzgebung verkompliziert damit den eigentlich einfach gehaltenen Therapieansatz erheblich. Um bioaktivierte Implantate wie das in der vorliegenden Arbeit vorgestellte NiTi-Implantat möglichst vielen Patienten zugänglich zu machen, müssten die Rahmenbedingungen zur Isolation und Verwendung von ASCs bzw. autologer Zellen allgemein vereinfacht werden. Andernfalls können nur Einrichtungen, die über Kapazitäten verfügen, um sich mit den nicht unerheblichen bürokratischen Hürden auseinander zu setzen, derartige innovative Therapieformen anbieten. Dies würde zu einer erheblichen Benachteiligung von Patienten außerhalb der Einzugsgebiete der Lizenzinhaber führen. Eine Anpassung der Gesetzgebung ist in Anbetracht der Therapie-Möglichkeiten, die autologe Zellen bieten, wünschenswert.

## Fazit

Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal die mögliche Kombination von ASCs mit NiTi und NiTi-Nanopartikeln. Die Zellen tolerieren das Material sehr gut und können darauf osteogen differenzieren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Induktion der osteogenen Differenzierung von ASCs über Implantat-induzierten mechanischen Stress möglich ist. Die gute Verträglichkeit beider Materialformen kann sowohl einzeln (SLM-generiertes Implantat oder Nanobeschichtung bereits zugelassener Implantate) als auch in Kombination beider Verfahren zur Anwendung kommen (Abb. 11).

Betrachtet man alle Schritte von Implantatherstellung bis hin zur Besiedlung mit Zellen bietet das entwickelte System eine Möglichkeit einer zeitnahen Therapie großer und/oder komplexer Knochendefekte mit einem individuellen Implantat. Die Herstellung an Hand von z.B. CT-Daten und die Isolation von ASCs könnten binnen eines Tages, die Besiedlung über Nacht erfolgen. Damit bietet das hier entwickelte Hybrid-Implantat eine interessante Alternative zum Tissue Engineering von Knochen.



*Abbildung 11 Anwendungsmöglichkeit eines SLM-NiTi-Implantates mit ASC-Besiedlung (zur Verfügung gestellt durch Prof. Vogt und Prof. Gellrich, Medizinische Hochschule Hannover)*

## Literatur

Anselme K (2000). Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21: 667-681.

Assad M, Jarzem P, Leroux MA, Coillard C, Chernyshov AV, Charrette S, Rivard CH (2003). Porous titanium-nickel for intervertebral fusion in a sheep model: Part 1. Histomorphometric and radiological analysis. *J Biomed Mat res Part B – Appl Biomat* 64B: 107-120.

Barcikowski S, Hahn A, Guggenheim M, Reimers K, Ostendorf A (2010). Biocompatibility of nanoactuators: stem cell growth on laser-generated nickel-titanium shape memory alloy nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research* 12: 1733-1742.

Baron R, Neff L, Louvard D, Courtov PJ (1985). Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100 kD lysosomal protein at the osteoclast ruffled border. *J Cell Biol* 101: 2210-2222.

Blackwood DJ. Biomaterials: past successes and future problems (2003). *Corros Rev* 21: 97-124.

Bobyn CE, Mortimer ES, Glassman AH, Engh CA, Miller JE, Brooks CE (1992). Producing and Avoiding Stress Shielding: Laboratory and Clinical Observations of Noncemented Total Hip Arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 274: 79-96.

Bodle J, End M, Hanson AD, Lobo EG (2011). Adipose-derived stem cells in functional bone tissue engineering: lessons from bone mechanobiology. *Tissue Engineering* 17: 195-211.

Bram M, Ahmad-Khanlou A, Heckmann A, Fuchs B, Buchkremer HP, Stöver D (2002). Powder metallurgical fabrication processes for NiTi shape memory alloy parts. *Material Science and Engineering* 337: 254-263.

Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S (1998). Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 16: 155-162.

Conejero J, Lee J, Parrett B, Terry M, Wear-Maggitti K, Grant R, Breitbart AS (2006). Repair of Palatal Bone Defects Using Osteogenically Differentiated Fat-Derived Stem Cells. *Plastic & Reconstructive Surgery* 117 (3): 857-863.

Cowan CM, Alami OO, Shi YY, Chou YF, Mari C, Thomas R, Quarto N, Nacamuli RP, Contag CH, Wu B, Longaker MT (2005). Bone Morphogenetic Protein 2 and Retinoic Acid Accelerate in Vivo Bone Formation, Osteoclast Recruitment, and Bone Turnover. *Tissue Engineering* 11(3-4): 645-658. doi:10.1089/ten.2005.11.645.

Deligianni D, Katsala N, Ladas S, Sotiropoulou D, Amedee J, Missirlis Y (2001). Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials* 22: 1241-1251.

Dragoo JL, Choi YJ, Liebermann JR, Huang J, Zuk PA, Zhang J, Hedrick MH, Benhaim P (2003). Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res* 21:622-629.

Dudziak S (2012). Beeinflussung der funktionellen Eigenschaften aktorischer Nickel-Titan-Legierungen durch die aktiven Parameter im Mikrolaserschmelzprozess. *Berichte aus dem LZH* ISBN: 978-3-943104-43-1.

Dudziak S, Gieseke M, Haferkamp H, Barcikowski S, Kracht D (2010). Functionality of laser-sintered shape memory alloy micro actuators. *Physics Procedia* 5B: 607-615.

European Commission Directive 2006/17/EC. *Official Journal of the European Union* 9.2.2006

European Commission Directive 2006/86/EC. *Official Journal of the European Union* 25.10.2006

Folkmann J, Hochberg M (1973). Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med.* 138: 745-753.

Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH (2006). Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in Biotechnology* 24 (4): 150–154.

Habijan T (2009a). Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen auf Nickel-Titan-Formgedächtnislegierungen. *Dissertation, Ruhr-Universität Bochum*



- Habijan T, Glogowski T, Kühn S, Pohl M, Muhr G, Köller M (2009b). Experimental setup for high strain induction to cell loaded metallic materials. *IFMBE Proceedings* 22 (17): 2165-2168.
- Habijan T, Glogowski T, Kühn S, Wittsiepe J, Greulich C, Eggeler G, Schildhauer TA, Köller M (2011). Can human mesenchymal stem cells survive on a NiTi implant material subjected to cyclic loading? *Acta Biomaterialia* 7: 2733-2739.
- Hahn A (2011). *Lasergenerierte Nanomaterialien für Bioaktive Implantate*. Berichte aus dem Laserzentrum. ISBN:978-3-943104-30-1
- Hahn A, Fuhlrott J, Loos A, Barcikowski S (2012). Cytotoxicity and ion release of alloy nanoparticles. *J Nanopart Res* 14: 686-696.
- Heintz C, Riepe G, Birken L, Kaiser E, Chafke N, Morlock M, Delling G, Imig H (2001). Corroded Nitinol Wires in Explanted Aortic Endografts: An Important Mechanism of Failure? *J Endovasc Ther* 8: 248–253.
- Hollander D, Wirtz D, von Walter M, Linker R, Schultheis A, Paar O (2003). Development of individual three-dimensional bone substitutes using „selective laser melting“ *European Journal of Trauma* 29: 228-234.
- Honda M, Fujimi TJ, Izumi S, Izawa K, Aizawa M, Morisue M, Tseucha T, Kanzawa N (2010). Topographical analyses of proliferation and differentiation of osteoblasts in micro- and macropores of apatite-fiber scaffold. *J Biomed Mater Res* 94A: 937-944.
- Jeswani S, Alexander MJ (2011). Nickel allergy: a reason for concern? *J NeuroInterventSurg* 3: 2-4.
- Knothe Thate ML (2003). “Whither flows the fluid in bone?” An osteocyte’s perspective. *J Biomech.* 36 (10): 1409-1424.
- Köhl M, Habijan T, Bram M, Buchkremer HP, Stöver D, Köller M (2009). Powder metallurgical near net shape fabrication of porous NiTi shape memory alloys for use as long-term implants by the combination of metal injection molding process with the space holder technique. *Adv Engineering Materials* 12: 959-968.

Kujala S, Ryhänen J, Danilov A, Tuukkanen J (2003). Effect of porosity on the osteointegration and bone ingrowth of a weight-bearing nickel titanium bone graft substitute. *Biomaterials* 24: 4691-4697.

Kuhbier J, Weyand B, Sorg H, Radtke C, Vogt PM, Reimers K (2010). Stammzellen aus dem Fettgewebe. *Chirurg* 81: 826–832.

Kusuzaki K, Kageyama N, Shinjo H, Takeshita H, Murata H, Hashiguchi S, Ashihara T, Hirasawa Y (2000). Development of bone canaliculi during bone repair. *Bone* 27: 655-659.

Lee KW, Wang S, Yazemski MJ, Lu L (2010). Enhanced cell ingrowth and proliferation through three-dimensional nanocomposite scaffolds with controlled pore structures. *Biomacromolecules* 11 (3): 682-689.

Lendeckel S, Jödicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, Berthold L, Howaldt HP (2004). Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic clavial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg* 32: 370-373.

Malaval L, Modrowski D, Gupta A, Aubin JE (1994). Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *Journal of Cellular Physiology* 158 (3): 555–572.

Mischen BT, Vollmar KE, Moyer KE, Buehrer B, Olbrich KC, Levin LS, Klitzman B, Erdmann D (2008). Metabolic and functional characterization of human adipose derived stem cells in tissue engineering. *Plast Reconstr Surg* 122: 725-738.

Morgan NB (2004). Medical shape memory alloy applications – the market and its products. *Mater Sci Endg – Struct mater Prop Microstruct Proc* 378: 16-23.

Palin E, Liu H, Webster T (2005). Mimicking the nanofeatures of bone increases bone-forming cell adhesion and proliferation; *Nanotechnology* 16: 1828–1835.

Pelled G, Tai K, Sheyn D, Zilberman Y, Kumbar S, Nair LS, Laurecin CT, Gazit D, Ortiz C (2007). Structural and nanoindentation studies of stem cell-based tissue-engineered bone. *Journal of Biomechanics* 40: 399-411.

Rachviandran R, Liao S, Ng C, Chan C, Raghunath M, Ramakrishna S (2009). Effects of nanotopography on stem cell phenotypes; *World J Stem Cells* 1 (1): 55-66.

Schäffler A, Büchler C (2007). Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells—Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies *Stem Cells* 25: 818 – 827.

Schmidt M, Badrinarayanan R, Müller V, Vogl T, Fejer G, Tchaptchet S, Keck S, Kalis C, Nielsen PJ, Galanos C, Roth J, Skerra A, Martin SF, Freudenberg MA, Goebeler M (2010). Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nature Immunology* 11: 814-820.

Shabalovskaya SA (1996). On nature of the biocompatibility and on medical applications of NiTi shape memory and superelastic alloys. *Bio-Med Mater Eng* 6: 267-89.

Shabalovskaya SA (2001). Physiochemical and biological aspects of nitinol as a biomaterial; *Int Mater Rev* 46: 230-250.

Shabalovskaya SA, Anderegg J, Van Humbeeck J (2008). Critical overview of Nitinol surfaces and their modifications for medical applications. *Acta Biomaterialia* 4: 447-467.

Tjabringa GS, Vezeridis PS, Zaandieh-Doulabi B, Helder MN, Wuisman PI, Klein-Nulend J (2006). Polyamides modulate nitric oxide production and COX-2 gene expression in response to mechanical loading in human adipose derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24: 2262-2269.

Tran N, Webster TJ (2009). Nanomaterials for bone materials. *Nanomed Nanobiotechnol* 1: 336-351.

Unger RE, Sartoris A, Peters K, Motta A, Migliaresi C, Kunkel M, Bulnheim U, Rychly J, Kirkpatrick J (2007). Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials* 28: 3965-3976.

Van Griensven M, Diederichs S, Roeker S, Boehm S, Peterbauer A, Wolbank S, Riechers D, Stahl F, Kasper C (2009). Mechanical straining using 2d and 3d bioreactors induces osteogenesis: implications for bone tissue engineering. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 112: 95-123

Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho A (2005). Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue and umbilical chord blood. *Exp Hematology* 33: 1402-1416.

Wang M, Crisostomo P, Herring C, Meldrum K, Meldrum D (2006). Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: 880-884.

Weyand B, Kasper C, Israelowitz M, Gille C, von Schroeder HP, Reimers K, Vogt PM (2012). *BioResearch* 1(3): 145-156. doi:10.1089/biores.2012.9901.

Zuk P, Zhu M, Ashjian P, De Urate d, Huang J, Mizuno H, Alfonso Z, Fraser J, Benhaim P, Hedrick M (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the cell* 13: 4279-4295.

Yanez R, Lamana ML, Garcia-Castro J, Colmenero I, Ramirez M, Bueren JA (2006). Adipose tissue derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* 24: 2582-2591.

Yeong WY, Chua CK, Leong KF, Chandrasekaran M (2004). Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *Trends in Biotechnology* 22 (12): 643-652.

Yoon E, Dahr S, Chun D, Gharibjanian N, Evans G (2007). In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Eng* 13: 619.

## Erklärung zur Dissertation

gemäß §6(1) der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

für die Promotion zum Dr. rer. nat.

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

*Mikrofunktionalisierte FG-Implantate*

selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls  
die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere  
Prüfungsarbeit verwendet.

# Curriculum Vitae

## Sarah Strauß

### Persönliche Angaben

Geburtsdatum	05.05.1982
Geburtsort	Essen
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Schulbildung

1988 – 1992	Grundschule Burgaltendorf
1992 – 1999	Carl-Humann Gymnasium Essen-Steele
1999 – 2001	Helmholtz-Gymnasium Essen-Rüttenscheid
06/2001	<i>Abschluss: Abitur (2,1)</i>

### Studium

2001 – 2006	Studium der Biologie, Ruhr-Universität Bochum
07/2006	<i>Abschluss: Diplom (1,6)</i>

### Berufserfahrung

10/2006 – 07/2008	wissenschaftliche Mitarbeiterin Labor für molekulare Gastroenterologie, Medizinische Klinik I, St. Josef Hospital Bochum, Klinikum der Ruhr-Universität Bochum
Seit 08/2008	wissenschaftliche Mitarbeiterin/Doktorandin Klinik für Plastische, Hand- und Wiederherstellungs-Chirurgie, Medizinische Hochschule Hannover



## Publikationsliste

A. Hahn, S. Barcikowski, M. Guggenheim, S. Strauß, B. Calcagno, K. Reimers (2009). Cell Growth on Nickel-Titanium Nanoparticles. *IBI Biomaterials* 3: 67.

Dudziak S, Strauss S, Herzog D, Reimers K, Haferkamp H, Vogt PM (2009). Microlasersintering of shape memory alloy scaffolds for hard tissue engineering. European Congress on Advanced Materials and Processes. *Advanced Engineering Materials, Euromat 2009*; 12 (7).

Strauß S, Hahn A, Barcikowski S, Ostendorf A, Reimers K, Vogt PM (2009). NiTi-Nanobeschichtungen zur schnellen und stabilen Integration von Implantaten. *Plastische Chirurgie* 9 (Suppl. 1): 95

Sarah Strauß (Hannover), S. Dudziak, S. Barcikowski, D. Herzog, K. Reimers, P. M. Vogt (2010). Nitinol-Netze und Fettstammzellen – ein Hybridimplantat. *Plastische Chirurgie* 10 (Suppl. 1): 80.

Sarah Strauß, Anne Hahn, Stephan Barcikowski, Kerstin Reimers, Peter M Vogt (2010). Nitinol-Nanopartikel zur Oberflächenmodifikation von Osteoimplantaten. *Plastische Chirurgie* 4: 253 – 255.

Sarah Strauß, Sonja Dudziak, Ronny Hagemann, Kerstin Reimers, Stephan Barcikowski, Dietmar Kracht, Christine Radtke, Peter M Vogt (2011) Ein Hybrid-Implantat für die mikrochirurgische Rekonstruktion osteogener Defekte. *German Medical Science GMS Publishing House DOI: 10.3205/11dgpraec265*.

S. Strauß, S. Dudziak, R. Hagemann, K. Reimers, S. Barcikowski, D. Kracht, P.M. Vogt (2011). Adipose derived stem cells and Nitinol - a bridge between bone tissue engineering and complete implants. *JSRM Volume 8, Issue 2. e-ISSN 0973-7154*.

Allmeling C, Strauss S (2011). Die Farbgebung des Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Aquaristik Fachmagazin* 221: 72 – 79, Tetra Verlag.

Christian Herold, Hans O. Rennekampff, Lea Ohm, Sarah Strauß, Jörn Linkner, Kerstin Reimers, Christina Allmeling, Bernhard Vaske, Peter M. Vogt (2012) Apoptosis in extracorporeal preserved inguinal fat flaps of the rat. Apoptosis Volume 17, Number 4, 400-409, DOI: 10.1007/s10495-011-0682-1.

S Strauß, S Dudziak, R Hagemann, S Barcikowski, M Fliess, M Israelowitz, D Kracht, JW Kuhbier, C Radtke, K Reimers, PM Vogt (2012). Induction of osteogenic differentiation of adipose derived stem cells by microstructured Nitinol actuator-mediated mechanical stress. PLoS ONE 7(12): e51264. doi:10.1371/journal.pone.0051264

Strauß S, Neumeister A, Barcikowski S, Kracht D, Kuhbier JW, et al. (2013) Adhesion, Vitality and Osteogenic Differentiation Capacity of Adipose Derived Stem Cells Seeded on Nitinol Nanoparticle Coatings. PLoS ONE 8(1): e53309. doi:10.1371/journal.pone.0053309

Allmeling C, Strauß S, Vogt PM, Reimers K (2013). “Axolotl” (*Ambystoma mexicanum*) Haltungsbedingungen, Aufzucht sowie haltungsbedingte Erkrankungen. Amphibia 12(1): 5 – 8.

Hennecke K, Redeker J, Kuhbier JW, Strauss S, Allmeling C, Kasper C, Reimers K, Vogt PM (2013). Bundles of spider silk, braided into sutures, resist basic cyclic tests: potential use for flexor tendon repair. Plos ONE (in press).

Strauß S, Ziegler T, Allmeling C, Reimers K, Frank-Klein N, Seuntjens R, Vogt PM (2013). Linking cytology with regenerative research and amphibian conservation: *In vitro* culture of skin cells from the Chinese giant salamander, *Andrias davidianus* (Blanchard, 1871) (Amphibia, Caudata, Cryptobranchidae). Amphibian and Reptile Conservation (submitted).

## **Danksagung**

Ich möchte Prof. Kerstin Reimers und Prof. Peter Vogt nicht nur für die verlässliche und fundierte wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit danken, sondern auch für die Möglichkeit mir bisher unbekannte Talente zu entdecken und diese weiter zu entwickeln.

Ich danke Prof. Ernst Ungewickell für die Übernahme des Ko-Referats, so wie Prof. Thomas Scheper und Prof. Udo Schmitz für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Dem gesamten Laborteam sei gedankt für eine äußerst kreative Arbeitsatmosphäre. Besonderer Dank gilt Christina Allmeling, deren langjährige Freundschaft und wissenschaftliche Zusammenarbeit mir sehr viel bedeutet.

Dr. Sonja Dudziak, Dr. Anne Neumeister und Ronny Hagemann sind als Kooperationspartner ein wichtiger Teil dieser wissenschaftlichen Arbeit. Bei ihnen möchte ich mich für gute Zusammenarbeit bedanken.

Die Zeit einer Doktorarbeit ist verbunden mit Höhen und Tiefen. Ohne Rückhalt bei Familie und Freunden wären einige Phasen weit schwieriger zu bewältigen gewesen. Ich möchte daher allen danken, die mit mir Erfolge gefeiert, mir aber auch wenn notwendig Mut gemacht haben.

Ich möchte abschließen mit einem besonderen Dank an meinen Lebensgefährten Malte Fließ für Unterstützung und Toleranz (insbesondere in arbeitsintensiven Phasen, in denen private Belange hintenan standen), sowie für fundierte wissenschaftliche Beratung und Diskussion, die meine Arbeit oft um wichtige Aspekte erweitert haben.