

Aus der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Die Etablierung des 3D-Drucks zur Rekonstruktion der weiblichen Brust

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
vorgelegt von

Paul Josef Steiner aus Leverkusen

Mainz, 2022

Tag der Promotion

12.07.2022

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	iii
Tabellenverzeichnis.....	iii
Abbildungsverzeichnis.....	iv
1. Einleitung.....	1
2. Literaturdiskussion.....	3
2.1 Die weibliche Brust.....	3
2.2 Das Mammakarzinom	4
2.3 Rekonstruktive Brustchirurgie	5
2.4 <i>Tissue Engineering</i> und 3D-Biodruck.....	6
2.5 3D-Druck in der Medizin.....	9
2.6 Verschiedene Methoden des 3D-Bioprinting.....	10
2.6.1 Extrusion-basierter Biodruck.....	11
2.7 Weich- und Brustfettgewebe Biodruck	11
2.8 STL-Files und G-Codes.....	13
2.9 Biotinten	13
3. Zielsetzung	16
4. Material und Methoden	18
4.1. Material	18
4.1.1. Chemikalien.....	18
4.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	20
4.1.3. Gebrauchsmaterialien	20
4.1.4. Geräte.....	21
4.1.5. Lösungen und Puffer	21
4.1.6. Medienzusätze.....	22
4.1.7. Medien.....	22
4.1.8. Microbeads	23
4.1.9. Zellen und Gewebeproben	23
4.1.10. Antikörper	24
4.2. Software.....	24
4.3. Methoden	25
4.3.1. Zellisolation.....	25
4.3.2. Zellkultur	30
4.3.3. Bedienung des 3D-Biodruckers	31

Abkürzungsverzeichnis

4.3.4.	Druckvorgang	38
4.3.5.	Drucken mit einzelnen Tinten	38
4.3.6.	Drucken mit Zellen	41
4.3.7.	Zellviabilitätsversuche mittels MTT	41
4.3.8.	Zellviabilitätsversuche mittels AlamarBlue	42
4.3.9.	Bi-Kultur adMSC + HDMEC	44
5.	Ergebnisse	48
5.1.	Einstellung der Druckparameter	48
5.1.1.	Azellulärer Testdruck: Bedrucken von Schwämmchen	48
5.1.2.	Drucken mit zwei Druckköpfen	49
5.1.3.	Drucken mit bovinem Kollagen-Gel	49
5.1.4.	UV-Aushärten von Gel Ma-Produkten	49
5.2.	adMSC-Isolierung	49
5.3.	adMSC-Differenzierung	51
5.4.	Zellviabilität im gedruckten Konstrukt	56
5.4.1.	Zellviabilitätsmessungen mittels MTT	56
5.4.2.	Zellviabilität, bestimmt über <i>AlamarBlue</i>	57
5.4.3.	Fibroblasten-Viabilität im gedruckten Konstrukt	58
5.4.4.	adMSC-Viabilität im gedruckten Konstrukt	61
5.5.	Viabilität von adMSC und Endothelzellen in Bi-Kultur	63
5.5.1.	Viabilität der Bi-Kultur HDMEC + adMSC in <i>Cellink Bioink</i>	63
5.5.2.	Viabilität der Bi-Kultur HDMEC + adMSC in <i>Gel Ma A</i>	64
5.6.	Histologie der gedruckten Bi-Kultur-Konstrukte	66
6.	Diskussion	68
6.1.	3D-Biodruck	68
	<i>Nozzle Clogging</i>	69
	Verwendung der richtigen Tinten	69
6.2.	adMSC Isolierung und Differenzierung	72
6.3.	Zellviabilitätsmessung mittels MTT-Assay	73
6.4.	Zellviabilitätsmessung mittels <i>AlamarBlue</i>	74
6.5.	Zellviabilität von Fibroblasten in gedruckter Mono-Kultur	74
6.6.	Zellviabilität von adMSC in gedruckter Mono-Kultur	75
	Resümee des 3D-Biodrucks von Mono-Kulturen	76
6.7.	Etablierung der 3D-gedruckten Bi-Kultur aus adMSC und HDMEC	76
7.	Ausblick	80
8.	Zusammenfassung	81

Abkürzungsverzeichnis

9. Quellen & Literaturverzeichnis	82
10. Anhang	86
10.1. Werte der Tabellen	86
10.2. G-Codes.....	89

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
3D	dreidimensional
adMSC	Adipozyte derived mesenchymal stem cells
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tage
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetal calf serum (Fetales Kälber Serum)
g	Fallbeschleunigung, 1G entspricht 9,81 m/s ²
h	Stunden
HDMEC	Human derived microvaskular endothelial cells
min	Minuten
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
PBS	Phosphate-buffered Saline
PH	Druckkopf
Pressure	Druck, der auf den Inhalt der Druckkartusche wirkt
SDS	Sodiumdodecylsulfat
STL	Stereolithografie
TNM-Klassifikation	Einteilung in Tumorstadien nach Tumorgröße, Lymphknoten und Metastasen
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1, verwendete Chemikalien.	18
Tabelle 3, verwendete Verbrauchsmaterialien.	20
Tabelle 4, verwendete Gebrauchsmaterialien.	20

Abbildungsverzeichnis

Tabelle 5, verwendete Geräte.	21
Tabelle 6, verwendete Lösungen und Puffer.	21
Tabelle 7, verwendete Medienzusätze.	22
Tabelle 8, verwendete Zellmedien.	22
Tabelle 9, verwendete Microbeads.	23
Tabelle 10, Zellen und Gewebeproben.	23
Tabelle 11, Antikörper.	24
Tabelle 12, Softwareeinstellungen.	24
Tabelle 12, Menge des zum Ablösen benötigten Trypsins in Abhängigkeit von der Größe der Zellkulturflasche.	30
Tabelle 13, wichtigste Codes für das Erstellen von G-Codes.[75].	33
Tabelle 14, Anleitung zum Erstellen eines kleinen Quadrats in ein Well einer 96-Well-Platte.	34

Abbildungsverzeichnis

Grafik 1 , nach [34], Bottom-up vs Top-Down Prinzip des Tissue Engineerings. Während das Bottom-Up Prinzip die einzelnen Bestandteile funktionstüchtigen Gewebes zusammengesetzt werden im Top-Down Ansatz die Zellen nach ihrer Isolation und Kultivierung mitsamt verschiedener Wachstums- und Differenzierungsfaktoren in ein poröses Scaffold gegeben und bewachsen dieses. ...	7
Grafik 2 , Bild nach [55] (a) Inkjet Bioprinting (b) Extrusion-basiertes Bioprinting (c) Laser assistiertes Bioprinting.	10
Grafik 3 , Ablauf der Erstellung und des Drucks dreidimensionaler Strukturen. Links im Bild: Screenshot der Website „tinkercad.com“; mittig Screenshot der Repetier Host Software; rechts im Bild: ein ausgedruckter Stern.	32
Grafik 4 , Versuchsaufbau für die Zellviabilitätsversuche.	36
Grafik 5 , Resazurin wird durch Zellaktivitäten in Gegenwart von NADH + H ⁺ zu Resofurin reduziert [78].	42
Grafik 6 , Ablauf 3D-Biodruck Bi-Kultur, a) die HDMEC wurden kultiviert b) HDMEC wurden ausgezählt und auf den Microcarriern angesiedelt c) adMSC wurden auf HDMEC-Medium umgestellt und aus der Flasche herausgelöst d) HDMEC auf Microcarrier und adMSC wurden gepoolt und gemeinsam in Biotinte gemischt e) die Bi-Kultur wurde in rasterförmigen Konstrukten gedruckt.	44
Grafik 7 , Ein mit Hydrogel genau bedrucktes, gefärbtes Schwämmchen; das klare Hydrogel hebt sich spiegelnd von dem mit rotem Medium gefärbten Kollagenschwämmchen ab.	48
Grafik 8 , Vergleich Bead-Isolation vs. nicht-Bead-isoliert. Alle Ansätze zeigen unregelmäßige, flächige Zellen. In den Kulturen sind die Beads deutlich zu erkennen, sowohl in der Bead-isolierten Probe als auch im Bead-Isolationsüberstand sind die Beads an die Zellen gebunden. Die Bead-Isolierten und nicht Bead-isolierten Zellen haben zu Tag 11 eine 25 cm ² vollgewachsen und wurden in 75 cm ² -Zellkulturflaschen überführt.	50
Grafik 9 , Immuncytochemische Färbung von CD34 am Tag der Isolation; Zellen wurden auf Objektträger aufzentrifugiert und fixiert. Die Immuncytochemie erfolgte mit CD34-Antikörpern.	51
Grafik 10 , Morphologie der Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung. Gezeigt sind Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellkultur am Tag vor Umstellung auf das Differenzierungsmedium und an den Tagen 7 und 14 nach Umstellung auf das Differenzierungsmedium.	52
Grafik 11 , adMSC bei Umstellung von Differenzierungs- auf Erhaltungsmedium, ganz rechts im Bild: Ausschnittsvergrößerung Fettvakuolen, mit Pfeil markiert.	53
Grafik 12 , Herauslösen der differenzierten adMSC aus den Zellkulturflaschen.	54

Grafik 13 , Differenzierte adMSC, Oil Red O und CD34-Immuncytochemisch gefärbt.	55
Grafik 14 , Zellviabilität von Fibroblasten in Cellink Bioink, Werte gemessen in Absorptionsdifferenzen zwischen 525 nm und 580 nm Wellenlänge mittels MTT-Assay. Für jeden Messzeitpunkt wurde eine eigene Platte mit je fünf Konstrukten unterschiedlicher Zellkonzentration bedruckt. Am Tag nach dem Druck (1 d) wurde der MTT-Assay angesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen sowie der daraus resultierende Standardfehler.	56
Grafik 15 , Viabilität im zeitlichen Verlauf (n=3), bestimmt über den Farbumschlag im AlamarBlue-Assay. Es sind relative Werte zum kleinen zelllosen Konstrukt bei 1 h im Verlauf von 24 h gezeigt. Hierfür wurden 96-Well-Platten mit je fünf Konstrukten einer bestimmten Zellkonzentration in bestimmter Form gedruckt. Während die zelllosen Konstrukte ihre Fluoreszenz im Verlauf der 24 h kaum ändern, ist vor allem bei den großen Konstrukten eine deutliche Zunahme zu erkennen. Nach 19 bzw. 24 h sind auch die kleinen Konstrukte mit wenigen Zellen deutlich von den Leerkontrollen zu unterscheiden. Der Standardfehler ist eingezeichnet.	58
Grafik 16 , Zellviabilität von Fibroblasten in Cellink Bioink (n=4). Hierfür wurden 96-Well-Platten mit je fünf Konstrukten einer bestimmten Zellkonzentration in verschiedener Größe gedruckt. Die Platten wurden über 14 Tage kultiviert. Die Viabilität wurde mithilfe eines über 19 h einwirkenden AlamarBlue-Assays bestimmt. Die Viabilität ist abzüglich der Viabilität der Leerkontrollen dargestellt. Der Standardfehler ist eingezeichnet. Die Viabilitätswerte der zellbeladenen Konstrukte zeigten über die 14 Tage einen Anstieg.	59
Grafik 17 , Zellviabilität von Fibroblasten in Gel Ma A (n=3). Es wurden 96-Well-Platten mit je fünf Konstrukten einer bestimmten Zellkonzentration in verschiedenen Konstruktgrößen bedruckt und über 14 Tage inkubiert. Die Viabilität wurde mithilfe eines über 19 h einwirkenden AlamarBlue-Assays bestimmt. Die Viabilität ist abzüglich der Viabilität der Leerkonstrukte dargestellt. Der Standardfehler ist eingezeichnet. Die Viabilitätswerte der zellbeladenen zeigen über 14 Tage einen konstanten Anstieg. .	60
Grafik 18 , Zellviabilität von adMSC in Cellink Bioink (n=3). Es wurden 96-Well-Platten mit je fünf Konstrukten in verschiedenen Konstruktgrößen bedruckt und über 14 Tage inkubiert. Die Viabilität wurde mithilfe eines über 19 h einwirkenden AlamarBlue-Assays bestimmt. Die Viabilität ist abzüglich der Viabilität der Leerkonstrukte dargestellt. Der Standardfehler ist eingezeichnet. Die Viabilitätswerte der zellbeladenen Konstrukte sind für den Messzeitraum deutlich positiv.....	61
Grafik 19 , Zellviabilität von adMSC in Gel Ma A (n=3). Es wurden 96-Well-Platten mit je fünf Konstrukten in verschiedenen Konstruktgrößen bedruckt und über 14 Tage inkubiert. Die Viabilität wurde mithilfe eines über 19 h einwirkenden AlamarBlue-Assays bestimmt. Die Viabilität ist abzüglich der Viabilität der Leerkonstrukte dargestellt. Der Standardfehler ist eingezeichnet. Insbesondere die Viabilitätswerte der mittelgroßen und großen Konstrukte sind über den Messzeitraum von 14 Tagen deutlich positiv.....	62
Grafik 20 , Beispielhafte gedruckte Konstrukte Bi-Kultur in Cellink Bioink, obere Zeile mit AlamarBlue nach 24 h Einwirkzeit. Die Konstrukte oben links sind mit Bi-Kultur gefüllt, oben rechts die Leerkontrollen zum Vergleich. Die Bi-Kultur-beladenen Konstrukte zeigen eine deutliche rosa Verfärbung des Zellmediums.	63
Grafik 21 , Viabilität von HDMEC und adMSC Bi-Kultur in Cellink Bioink, mit Standardfehler. Es wurden 6x6 mm große, zweilagige Gitter mit $1,5 \times 10^6$ HDMEC/ml auf Microcarriern und 500 000 adMSC/ml in Cellink Bioink gedruckt. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe eines 24 h einwirkenden AlamarBlue-Assays determiniert und ist abzüglich der Viabilitätswerte der Leerkontrolle dargestellt. Der Standardfehler ist	

Abbildungsverzeichnis

- eingezeichnet. Die Viabilitätswerte der Bi-Kultur sind über den Messzeitraum von 21 Tagen deutlich positiv und scheinen ab Tag 5 eine Abwärtstendenz zu zeigen.....64
- Grafik 22**, Viabilität von HDMEC und adMSC Bi-Kultur in Gel Ma A, mit Standardfehler. Es wurden 6x6 mm große, zweilagige Gitter mit $1,5 \times 10^6$ HDMEC / ml auf Microcarriern und 500 000 adMSC / ml in Gel Ma A gedruckt. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe eines 24 h einwirkenden AlamarBlue Assays determiniert und ist abzüglich der Viabilität der Leerkontrolle dargestellt. Der Standardfehler ist eingezeichnet. Die Viabilitätswerte der Bi-Kultur sind für den Messzeitraum von 21 Tagen deutlich positiv.65
- Grafik 23**, CD31 und CD34 immunhistochemisch gefärbtes Konstrukt, Bi-Kultur in Cellink Bioink nach fünf Tagen Kultivierung. Es sind einzelne Zellen auf den Schnitten zu erkennen (mit Pfeilen markiert). Obere Reihe: 10x Objektiv, untere Reihe 20x Objektiv.66
- Grafik 24**, CD31 und CD34 immunhistochemisch gefärbtes Konstrukt einer Bi-Kultur in Cellink Bioink an Tag 22. Während der Microcarrier mit der Hämalaun-Gegenfärbung stark angefärbt wird, sind in dem gefärbten Schnitt keine Zellen zu sehen. Der Microcarrier ist exemplarisch rechts im Bild mit einem Pfeil markiert.....67

1. Einleitung

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung der Frau [1]. Im Laufe ihres Lebens erkrankt jede achte Frau an einem Mammakarzinom; dieses wird bei den meisten Patientinnen chirurgisch entfernt [1]. Während noch in den 90er Jahren zumeist eine radikale Mastektomie, die komplette Entfernung der Brust, Standard war, werden heutzutage die meisten Karzinome brusterhaltend operiert [2].

Die brusterhaltende Therapie bei einem lokal begrenzten Karzinom führt zu ähnlichen Überlebensraten wie die komplette Entfernung der Brust [3]. Obwohl sie die erste Wahl bei den meisten Karzinomen ist, schafft auch die brusterhaltende Therapieform Gewebedefekte in der weiblichen Brust. Diese Gewebedefekte können entweder durch ein autologes oder durch ein heterologes Verfahren rekonstruiert werden. Die Rekonstruktion der Brust steigert die Lebensqualität der Patient*innen [4]. Bei der autologen Rekonstruktion ist ein weiterer Eingriff zum Gewinnen des Transplantates nötig [3]. Die heterologe Rekonstruktion der Brust erfolgt beispielsweise mit Silikon. Die heterologe Rekonstruktion mittels Silikons bietet genau wie die autologe Rekonstruktion Nachteile und Gefahren, wie beispielsweise das Versagen des Implantats oder eine Kapsel-fibrose [5].

Eine Lösung der hier dargestellten Problematik könnte das *Tissue Engineering* bieten. Hierbei können patientenspezifische, dreidimensionale Gewebe *de novo* hergestellt werden, die als Fettgewebsimplantate die Verfahrenspalette der Brustrekonstruktion erweitern können. *Tissue Engineering* beschreibt die *in vitro*-Züchtung von vitalem, dreidimensionalem Gewebe, welches Eingang in die rekonstruktive Chirurgie finden kann [6]. Durch die Verwendung *autologer* Zellen können idealerweise Abstoßungsreaktionen umgangen werden. Das Erschaffen dreidimensionalen Gewebes erfordert neben verschiedenen Zellreihen ein *Scaffold*, also ein Gerüst, in dem die Zellen ein-wachsen können, und verschiedene Faktoren, um das Zellwachstum und die Zelldif-ferenzierung zu steuern [7]. Das *Scaffold*, beispielsweise auf Kollagen basierend, kann im *Tissue Engineering* als Ersatz für die Extrazellulärmatrix dienen und bietet den Zel-len die Möglichkeit, im gewohnten dreidimensionalen Umfeld zu proliferieren, differen-zieren, migrieren und Zell-Zellkontakte auszubilden [8, 9].

Die rekonstruktive und regenerative Medizin kombiniert biologisch medizinische An-sätze des *Tissue Engineering* mit rekonstruktiv chirurgischen Prozeduren. Hier können

Einleitung

Gewebe verwendet werden, die mit patienteneigenen Zellen besiedelt sind. Durch *in vitro* hergestelltes Gewebe kann eine *autologe* Transplantation in den meisten Fällen gewährleistet werden und birgt Vorteile, vor allem in Hinblick auf Abstoßungsreaktionen [10].

Mittels *Tissue Engineering* und beispielsweise 3D-Biodruck mit patienteneigenen Zellen kann so ein Transplantat entstehen, das eine *autologe* Transplantation ermöglicht, ohne die Notwendigkeit einer zusätzlichen Operationsstelle. Außerdem ist ohne den Einsatz von Silikon auch keine Folgeoperation notwendig. Nicht nur in der brusterhaltenden Therapie des Mammakarzinoms ist das Drucken von Fettgewebe eine interessante Option. Auch in weiteren Feldern der rekonstruktiven Chirurgie könnten autologe Fettgewebstrukturen eingesetzt werden.

Der 3D-Biodruck mit patienteneigenen Zellen wird für verschiedene Organsysteme bereits erfolgreich eingesetzt, wie beispielsweise Knochen oder Haut [11, 12]. Der Auswahl der richtigen Biotinten, aus denen der 3D-Biodrucker Scaffolds erstellen kann, kommt hierbei eine entscheidende Bedeutung zu, ebenso der Auswahl der richtigen Zelltypen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einem *Inkredibile+* 3D-Drucker der Firma *Cellink* gearbeitet. Es war naheliegend für den Anfang auch Standard-Tinten dieser Firma zu verwenden. Um zu untersuchen, welche Tinte sich am besten zum Druck von vitalen Brustgewebszellen eignet, wurden drei verschiedene Tinten getestet:

- Eine Tinte auf Gelatine-Basis (*Gel Ma A*)
- Die Standardtinte der Firma *Cellink* (*Cellink Bioink*)
- Eine Tinte basierend auf bovinem Kollagengel

Die Hauptzelllinien der weiblichen Brust, abgesehen von den drüsigen Anteilen, sind Fibroblasten, mesenchymale Fettgewebsstammzellen und Endothelzellen für die Gefäßversorgung. Diese Zellen lassen sich sowohl in Mono- als auch in Bi- und Tri-Kultur kultivieren. Auch in einem dreidimensionalen Kollagen-Gel war eine Zellviabilität nachzuweisen [13].

Diese drei Zelllinien in dreidimensional gedruckten Konstrukten könnten einen vielversprechenden Ansatz auf dem Weg zur *in vitro*-Gewinnung von Transplantaten für die weibliche Brust darstellen und sollen in dieser Arbeit untersucht werden.

2. Literaturdiskussion

2.1 Die weibliche Brust

Die Brustdrüse ist aus 10-20 Drüsenlappen aufgebaut. Sie produziert zur Ernährung des Säuglings die Muttermilch. Jeder Drüsenlappen beinhaltet zahlreiche Drüsenendstücke, die in Milchgängen zusammenfließen und in der Mamille enden [14].

Die Drüse wird von einem Binde- und Fettgewebe umgeben. Während das Bindegewebe vornehmlich eine Stützfunktion einnimmt, dient das Fettgewebe als Wärmeisoliator und übernimmt bei der laktierenden Mamma einen Teil des Hormonstoffwechsels, indem Lipide und Östrogene produziert, gespeichert und freigegeben werden können. Zusätzlich können im Fettgewebe lipophile Hormone gespeichert werden [15]. Die Hauptzelllinien des Fettgewebes sind Fettzellen, die aus adipösen mesenchymalen Stammzellen entstehen und die Hauptspeicher- und Isolierungsfunktion des Brustfettgewebes ausmachen. Die extrazelluläre Matrix, die den Großteil des Binde- und Stützgewebeapparats ausmacht, wird vorrangig von Fibroblasten gebildet, die zudem verschiedene Botenstoffe ausschütten und damit die Gefäßproliferation durch Endothelzellen anregen [16]. Insbesondere die Faktoren VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), Angiopoetine, FGF 1 und FGF 2 (Fibroblast Growth Factor 1 und 2) und deren jeweilige Rezeptoren nehmen im Bereich der Vaskulogenese eine herausragende Stellung ein [17]. Die Gefäßinnenwände werden durch Endothelzellen ausgekleidet. Bei der Gefäßneubildung werden Angio- von Vaskulogenese unterschieden. Während Vaskulogenese die komplette Neubildung von Gefäßen aus Vorläufer- und Stammzellen beispielsweise in der Embryonalentwicklung beschreibt, umfassen Prozesse der Angiogenese das Aussprosseln von Gefäßen aus schon bestehenden Gefäßen [18, 19]. Hierbei ist die Gefäßneubildung abhängig von einer fein abgestimmten Kommunikation zwischen den Endothelzellen und den Binde- und Stützgewebszellen, die sie umgeben [20]. Der Extrazellulärraum, in dem Gefäße entstehen, unterliegt somit ständigem Umbau durch die Fibroblasten, die, sobald sich Gefäße gebildet haben, auch die Bildung eines perivaskulären Raums übernehmen. Hierfür werden Fibroblasten nach Gefäßbildung wieder von den Endothelzellen der neugebildeten Gefäße zur Differenzierung zu Perizyten induziert [21]. Während eine fehlgeleitete, nicht ausreichende Vaskulogenese zur Nekrose des zu versorgenden Gewebes führt, kommt einer gesteigerten Vaskulogenese beispielsweise beim Tumorwachstum oder bei Hei-

Literaturdiskussion

lungsprozessen eine markante Rolle zu [21]. Fibroblasten, Fettgewebszellen und Endothelzellen bilden also die Hauptzelllinien von Fett- und Bindegewebe, wie es den Drüsenkörper der weiblichen Brust umgibt. Der Drüsenkörper der weiblichen Brust besteht aus epithelialen Drüsenzellen, aus denen das Mammakarzinom hervorgehen kann.

2.2 Das Mammakarzinom

Das Karzinom der Brustdrüse stellt die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau dar [1]. Mit dem zwischen 2005 und 2009 eingeführten und seitdem von der gesetzlichen Krankenkasse übernommenen Mammographie-Screening ist die Inzidenz des Mammakarzinoms zwar gestiegen, die Mortalität allerdings nur geringfügig gesunken. Das bei jeder achten Frau auftretende Mammakarzinom wird in der Mehrzahl der Fälle chirurgisch entfernt [1]. Männer sind von etwa 1 % aller Brustkrebsdiagnosen betroffen [22]. Die chirurgische Entfernung des Mammakarzinoms erfolgt nach Möglichkeit brusterhaltend, sodass nicht die komplette Brust entfernt wird sondern lediglich das Karzinom mit dem dazugehörigen Sicherheitsabstand entfernt wird [2]. Eine mögliche Bestrahlung kann je nach Tumorart, Stadium und Wunsch der Patient*in angeschlossen werden [2].

Die drüsigen Anteile der Brust, insbesondere ihre Endstücke und Ausführungsgänge, neigen zur malignen Entartung. Hier werden duktale Malignome, also vom Ausführungsgang ausgehend, von lobulären Malignomen, also aus den Drüsenläppchen hervorgehend, abgegrenzt. Häufig ist eine eindeutige Zuordnung zu einer der beiden Ursprungszelllinien des Malignoms nicht möglich, sodass das invasive Karzinom ohne spezifischen Typ einen Großteil der Mammakarzinome darstellt [23]. Die Einteilung in einen Schweregrad erfolgt anhand der Eindringtiefe des Karzinoms und der Metastasenbildung. Hier werden beispielsweise Karzinome, die die Basalmembran noch nicht durchdrungen haben (*Carcinoma in situ*) von Karzinomen unterschieden, die bei Diagnose bereits über die Basalmembran hinausgewachsen sind. Die Stadieneinteilung erfolgt dann anhand des TNM Stadiums. Hierbei werden Tumorgröße, Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen in beispielsweise Lunge oder Gehirn berücksichtigt [24]. Außerdem lassen sich Mammakarzinome anhand der exprimierten Oberflächenrezeptoren einteilen. Hierbei werden insbesondere Oberflächenmarker, die Einfluss auf die systemische Therapie der Brustkrebserkrankung, wie Her2- und Östrogenre-

Literaturdiskussion

zeptorstatus des Karzinoms, untersucht [3]. Generell haben Karzinome mit einer geringeren Infiltrationstiefe und weniger Lymphknotenmetastasen, sowie Karzinomen mit einem positiven Rezeptorstatus eher eine bessere Prognose als tief infiltrierende, stark metastasierte Karzinome [24]. Die Entscheidung über die Therapie wird anhand des TNM Stadiums, des Rezeptorstatus und des Patient*innenwunsches getroffen. Bei einer chirurgischen Intervention führt die brusterhaltende Therapie zu vergleichbaren Überlebensraten wie die komplette Entfernung der Brust [3], weshalb dies die bevorzugte Vorgehensweise darstellt.

2.3 Rekonstruktive Brustchirurgie

Auch die brusterhaltende Therapie, die bei den meisten Mammakarzinomen Standard ist, schafft Defekte in der Brust, die durch ein autologes oder durch ein heterologes Verfahren, beispielsweise mit Silikon, rekonstruiert werden können. Zum Gewinnen des Transplants ist bei der autologen Rekonstruktion in der Regel ein zweiter Schnitt nötig [3]. Die autologe und die heterologe Rekonstruktion der Brust nach brusterhaltender Therapie des Mammakarzinoms soll im Folgenden kurz erläutert werden.

Die autologe Rekonstruktion erfolgt in der Regel durch einen Gewebslappen. Dieses Gewebe kann entweder mitsamt dem versorgenden Gefäß entfernt und dann reimplantiert werden („freie Rekonstruktion“) oder es wird in einer gestielten Lappentechnik operiert, sodass die Gefäßversorgung des Gewebes belassen und das Gewebe lediglich zur Rekonstruktion der Brust „herübergezogen“ wird. Hierbei bleibt die Blut- und Nährstoffversorgung des Gewebes anhand seiner ursprünglichen Gefäße erhalten. Bei einer freien Rekonstruktion müssen mittels Mikrochirurgie die Gefäße des Transplantats an die Gefäße der Region (in diesem Fall der inneren Brustkorbarterie) angeschlossen werden [25-27]. Während freie autologe Verfahren auf Gewebestücke aus der Abdominalregion, des Gesäßes oder des inneren Oberschenkels zurückgreifen, ist bei gestielten Lappenplastiken der Rückenmuskel mitsamt Haut und Bindegewebe eine Möglichkeit der Rekonstruktion. Bei kleineren Gewebetransplantaten ist die Kombination mit einem Silikonimplantat möglich [25]. Ein weiterer Ansatz ist die Unterspritzung von Brustdeformitäten mit durch Liposuktion gewonnenem, autologen Fettgewebe, welches mit Fettgewebstammzellen angereichert wurde [28].

Die heterologe Rekonstruktion mittels Silikonimplantat erfolgt entweder durch das direkte Einsetzen des Silikonimplantats zwischen die beiden Brustmuskeln oder in einem zweizeitigen Verfahren. Häufig ist die direkte Variante aufgrund der Anatomie der

Literaturdiskussion

Brusthaut und der Brustmuskulatur nicht direkt möglich, sodass im zweizeitigen Vorgehen vor dem Einsatz des endgültigen Implantats ein Expander eingesetzt wird. Dieser wird über einige Wochen Schritt für Schritt erweitert, sodass in einer zweiten Operation der Expander entfernt und das Implantat eingesetzt werden kann [29-31]. Neben der zweizeitigen Operation kann es im Zuge der silikongestützten Brustrekonstruktion zu Hämatomen, Infektionen oder Brustasymmetrien kommen. Auch kann sich um den Fremdkörper eine Kapselbildung ausbilden, sodass das Implantat entfernt werden muss [32, 33]. Dies birgt für die Patient*innen einen nicht zu vernachlässigenden, kritisch zu erwähnenden, Nachteil.

Um ästhetische Gewebsdefekte in der Brust ohne Deformationen, Dellen oder Verhärtungen an der Haut auszugleichen, wird passgenaues, auf die Patient*innen zugeschnittenes Brustgewebe benötigt. Es gilt die Vorteile des autologen und des heterologen Verfahrens zu vereinen und die Nachteile der beiden Methoden zu vermeiden. Dies könnte mit einem 3D-gedruckten Gewebe aus patienteneigenen Zellen verwirklicht werden. Es erspart sich die Notwendigkeit eines zweiten Schnitts bei der autologen Rekonstruktion genau wie die oben beschriebenen Gefahren einer heterologen Rekonstruktion mittels Silikons.

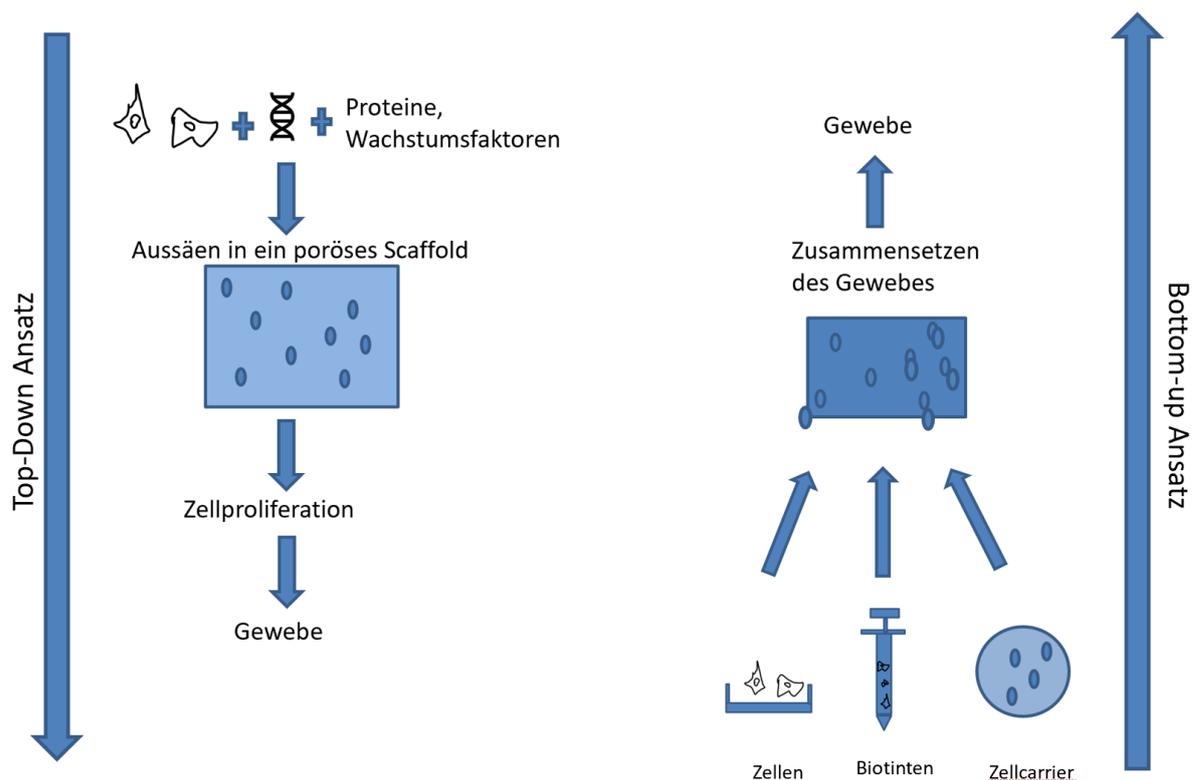
2.4 *Tissue Engineering* und 3D-Biodruck

Die genannte Technik des 3D-Biodrucks ist eine Technik des *Tissue Engineering*. *Per definitionem* beschreibt *Tissue Engineering* die Züchtung von lebendem Gewebe, welches zur Implantation oder zu Forschungszwecken genutzt werden kann [6]. Es werden zwei verschiedene Ansätze unterschieden und im Folgenden erläutert.

In einem ersten Ansatz „von Oben nach unten“ oder „Top Down“ (Grafik 1, links) werden Zellen aus Geweben isoliert und in einer Zellkultur vermehrt. Dies geschieht über die Bereitstellung von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren mit speziellen Kulturmedien. Nach der Expansion der Zellkultur, werden die vereinzelt Zellen auf bzw. in ein vorgefertigtes, der zu ersetzenden Stelle nachempfundenen, poröses Gerüst (ein Scaffold, beispielsweise basierend auf einer Kollagenmatrix) gegeben. Die Zellen bewachsen dieses Scaffold und es entsteht ein komplexes, zusammenhängendes Gewebe. Diesem Ansatz sind noch starke Grenzen gesetzt, beispielsweise durch die nicht ausreichend schnelle Vaskularisierung, Begrenzung der Diffusion und geringe

Literaturdiskussion

sowie heterogene Verteilung der Zellkonzentration [34]. In einem zweiten Ansatz „von unten nach oben“ oder „Bottom up“ (Grafik 1, rechts) werden Zellen, die umgebende extrazelluläre Matrix und alle weiteren einzelnen Bestandteile kompletten Gewebes isoliert und im Anschluss mithilfe moderner Methoden, wie beispielsweise einem 3D-Biodrucker, zu komplexem Gewebe zusammengesetzt. Hierbei könnten Nachteile des ersten Ansatzes, wie die nicht ausreichende Vaskularisierung und die heterogene Verteilung der Zellkonzentration, teilweise umgangen werden [34].



Grafik 1, nach [34], *Bottom-up vs Top-Down Prinzip des Tissue Engineerings*. Während das *Bottom-Up* Prinzip die einzelnen Bestandteile funktionstüchtigen Gewebes zusammengesetzt werden im *Top-Down* Ansatz die Zellen nach ihrer Isolation und Kultivierung mitsamt verschiedener Wachstums- und Differenzierungsfaktoren in ein poröses Scaffold gegeben und bewachsen dieses.

Die Größe des Konstrukts, welches mittels Tissue Engineering geschaffen wird, ist ein entscheidender Faktor und ein bisheriges Limit der *Tissue Engineering*-Technologie. Gewebe, wie beispielsweise Knorpelgewebe, welches keine Gefäße enthält, wird physiologisch mittels Diffusion nur über wenige Millimeter ernährt [35]. Wenige Millimeter stellen also für die Ernährung von Zellen ausschließlich durch Diffusion eine Grenze dar, wobei bei Knorpelgewebe diese Grenze durch Kompression und Dekompression überwunden wird [36]. Eine ähnliche Problematik stellt sich auch bei der Herstellung

Literaturdiskussion

größerer dreidimensionaler Konstrukte mittels Tissue Engineering [37, 38]. Sobald solide dreidimensionale Konstrukte über mehrere Millimeter groß sind, erreichen die Nährstoffe über Diffusion nicht mehr die innenliegenden Zellen. In physiologischem Gewebe wird dieses Diffusionshindernis durch eine Gefäßversorgung überwunden. Auf diese Art und Weise gelangen Sauerstoff und Nährstoffe zu den sich im Gewebeverband befindenden Zellen, außerdem werden so Abfallprodukte abtransportiert. In einem *in vitro* erstellten Konstrukt darf dementsprechend eine gewisse Größe nicht ohne Versorgungsstrukturen überschritten werden. Für die Bildung von Gefäßstrukturen sind die Prozesse der Angiogenese und der Vaskularisierung entscheidend [18].

Versorgungsstrukturen innerhalb dreidimensionaler Konstrukte können beispielsweise poröse Scaffolds sein, die für das *Tissue Engineering* genutzt werden. Alternativ können endotheliale Zellen mit in das *Scaffold* eingebracht werden, die innerhalb des *Scaffolds* eine gefäßähnliche Struktur aufbauen [39]. Auch können die genutzten Hydrogele eine mikroskopisch poröse Struktur aufweisen. Alternativ kann innerhalb mittels 3D-Druck gefertigte Konstrukte eine vaskuläre Struktur eingedruckt und mit Nährmedium und Endothelzellen durchspült werden [40]. Mittels präziser Drucktechnik können auch mit ausschmelzbarer Biotinte feinere Gefäßstrukturen in das Konstrukt eingedruckt werden, die dann mittels biomechanischer Methoden ausgespült werden können [41]. Es gilt für jedes Gewebe die richtige Methode zum Prävasikularisieren der Konstrukte herauszufinden.

Mittels *Tissue Engineering* ist es bereits möglich, eine Vielzahl unterschiedlicher Gewebe zu konstruieren. So ist beispielsweise gelungen, Haut-, Knochen- und Knorpelgewebe mittels *Tissue Engineering* zu konstruieren. Auch im Bereich neuraler, kornealer und vaskulärer Gewebestrukturen zeichnen sich große Fortschritte ab [34, 42-47].

Unter 3D-Biodruck werden Methoden des *Tissue Engineering* verstanden, bei denen lebende Zellen mit einer Biotinte vermischt werden, welche dann von einem 3D-Drucker in ein Konstrukt gedruckt wird. Biotinten bestehen aus verschiedenen Biomaterialien, die von einem 3D-Biodrucker in spezifische Formen gedruckt werden können. Vor dem Druck wird hierbei ein Zell-Tintengemisch hergestellt. Dieses kann durch die unten beschriebenen verschiedenen Verfahren in dreidimensionale Form gedruckt werden. Nach dem Druck müssen die Tinten ausgehärtet werden, um in ihrer Form stabil zu bleiben. Dies erfolgt je nach den Bestandteilen der Tinte mit unterschiedlichen Methoden.

2.5 3D-Druck in der Medizin

Der 3D-Druck wird in vielen Bereichen der Technik und Forschung genutzt und hat auch in der Medizin heutzutage seinen Stellenwert [48].

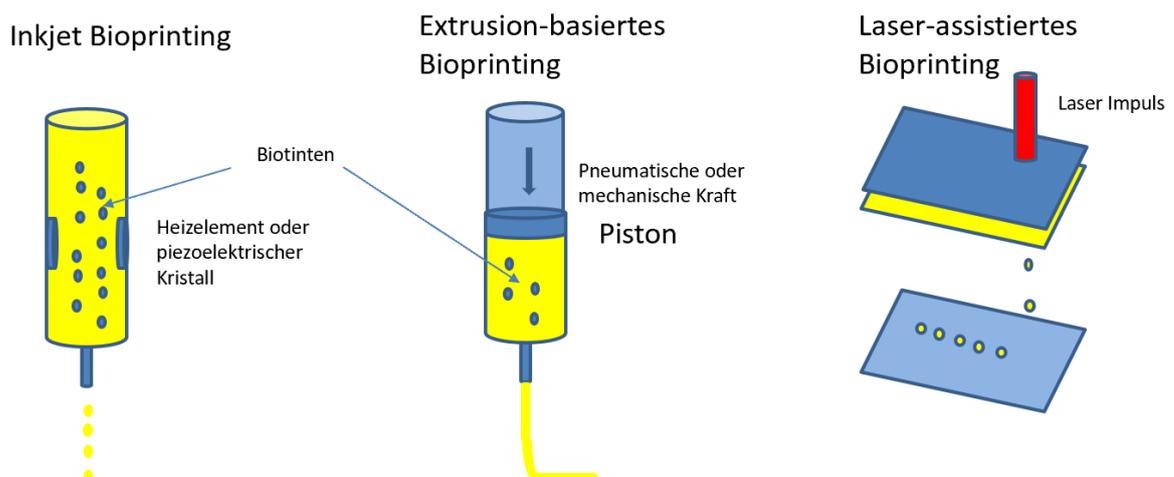
Für medizinische Zwecke wird der 3D-Druck mit vitalem Gewebe von dem Druck mit avitaler Matrix unterschieden. Das dreidimensionale Drucken mit avitalen Kunststoffen, beispielsweise für Prothesen, ist für medizinische Zwecke bereits etabliert. So können Prothesen entstehen, die passgenau auf den Patienten zugeschnitten sind [49]. Auch komplizierte Operationen lassen sich mittels 3D-Druck patientenindividuell üben und planen. So kann beispielsweise die Aorta des Patienten nach vorheriger Bildgebung dreidimensional als Modell gedruckt werden und Operationen, wie das Einsetzen eines Stents, daran geübt werden [50]. Während avitaler 3D-Druck auch in medizinischen Anwendungsbereichen schon länger etabliert ist [51], ist der 3D-Druck als Teil des bottom-up Prinzips des *Tissue Engineering* noch weniger erforscht.

Durch den Einsatz von 3D-gedruckten Bioimplantaten kann eine Abstoßungsreaktion in den meisten Fällen vermieden werden [52]. Abstoßungsreaktionen entstehen häufig dadurch, dass der Körper die transplantierten Organe als „fremdartig“ erkennt. Die Abstoßungsreaktionen gehört zu den kritischen Komplikationen auf eine allogene Organtransplantation, also die Transplantation eines Organs von einem anderen Individuum derselben Spezies. Um diese Abstoßungsreaktion zu verhindern sind viele Patienten nach ihrer Transplantation lange, zum Teil lebenslänglich, auf eine Immunsuppression angewiesen. Die Behandlung mit Immunsuppressiva nach *allogener* Organtransplantation birgt immer auch die Gefahr einer Infektion [53]. Demgegenüber ruft die Transplantation mit einem *in vitro* hergestellten, gedruckten Organ keine solche Reaktion hervor, da die Zellen genetisch denen des Spenders gleichen. Trotz der patienteneigenen Zellen kann es zu einer Immunreaktion auf das Transplantat kommen, da die extrazelluläre Matrix schon eine solche Abstoßungsreaktion hervorrufen kann. Lediglich wenn man nicht nur die Zellen als Bausteine, sondern auch die Extrazelluläre Matrix des Patienten als Tinte verwendet, ist der Patient mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer Abstoßungsreaktion geschützt und ist im Laufe seines Lebens nicht auf Immunsuppressiva angewiesen [10]. Wurden nach dem 3D-Druck Konstrukte, die nicht nur die Zellen der jeweiligen Versuchstiere enthielten sondern auch mittels Tinte aus dem Gewebe der Versuchstiere, in jeweilige Versuchstiere implantiert, war keine Abstoßungsreaktion zu beobachten [54].

2.6 Verschiedene Methoden des 3D-Bioprinting

Für den 3D-Druck mit vitalen Zellen sind verschiedene Arten des Drucks beschrieben. Beim Inkjet Bioprinting (Grafik 2, a) werden durch einen elektrischen oder temperaturgesteuerten Impuls kleine Blasen innerhalb der Tinte zum Platzen gebracht und es entstehen Tropfen, die so gedruckt werden können. Hierbei werden sehr hohe Auflösraten im Druck erreicht. Das Extrusion-basierte Bioprinting (Grafik 2, b) gleicht einer einfachen Spritze: ein Piston wird mittels Luftdruck oder direkter mechanischer Wirkung heruntergedrückt und drückt einen konstanten Fluss aus Tinten-Zellgemisch aus. Das Laser-assistierte Bioprinting (Grafik 2, c) nutzt einen Laser, der kleine Tropfen aus dem Tinten-Zellgemisch herauslöst und auf den Empfänger aufdrückt. Die Druckgeschwindigkeit ist abhängig von der Frequenz, mit der Impulse auf die Trägerplatte gegeben werden können (Grafik 2, c) [55].

Die Methoden werden durch die verwendeten Druckköpfe definiert. Diese Druckköpfe werden in einem 3D-Drucker im Raum frei bewegt. Anhand eines digitalisierten Bauplans druckt der Drucker an definierten Stellen in diesem dreidimensionalen Raum definierte Mengen an Tinte. Die Eigenschaften der Tinte, die Überlebenseigenschaften der Zellen und die benötigte Auflösung des gedruckten Konstrukts entscheiden über die Wahl der Methode des 3D-Bioprinting.



Grafik 2, Bild nach [55] (a) Inkjet Bioprinting (b) Extrusion-basiertes Bioprinting (c) Laser assistiertes Bioprinting.

2.6.1 Extrusion-basierter Biodruck

In dieser Arbeit wird mit dem *Inkredible+* 3D-Drucker der Firma *Cellink* gearbeitet. Bei diesem Drucker sind Extrusion-basierte Druckköpfe eingebaut, weswegen hier auf diese Methode des 3D-Biodrucks näher eingegangen wird. Beim Extrusion-basierten 3D-Biodruck wird, nachdem das Zell-Tintengemisch in eine Kartusche gefüllt wurde, diese mit einer Spitze in gewünschter Größe bestückt und in den 3D-Drucker eingesetzt. Der 3D-Drucker kann jetzt mit variablen Druckstärken zum Herausdrücken des Zell-Tintengemisches ausgerüstet werden. Anschließend verfolgt der Drucker anhand eines spezifischen Codes ein vorgegebenes Reismuster im dreidimensionalen Raum und öffnet an den dafür vorgesehenen Stellen die Klappe des Druckkopfs, sodass Tinte mit dem eingestellten Druck herausfließt.

2.7 Weich- und Brustfettgewebe Biodruck

Für Weichgewebe Biodruck ist der 3D-Druck von Hautgeweben interessant. Hier ist es bereits möglich, in einem standardisierten Vorgehen Hautäquivalente zu drucken [56]. Dabei werden Fibroblasten in der Biotinte gedruckt und die Konstrukte mit Epithelzellen besiedelt, eine Gefäßversorgung wird nicht sichergestellt. Das Drucken von einer subdermalen Schicht, in die Fibroblasten eingedruckt werden, mitsamt Epidermis ist ebenfalls schon in einem standardisierten Prozess festgehalten [57]. Hierbei konnte auch die Epithelschicht histologisch dargestellt werden.

Dreidimensionaler Druck von Gewebekonstrukten zur Rekonstruktion der Brust verspricht einen Ersatz für herkömmliche Verfahren zur Rekonstruktion der weiblichen Brust nach einer Mastektomie im Rahmen eines Mammakarzinoms [58]. Es gilt für den Ersatz von Brustfettgewebe Konstrukte zu standardisieren, die die mechanischen Eigenschaften der natürlichen Brust besitzen und auch nach Implantation nicht verlieren. Methoden des *Tissue Engineering* zeigen im Bereich der Brustrekonstruktion bisher Fortschritte in der Rekonstruktion der Mamille und der umgebenden Bereiche [59]. Hierbei lässt sich unter anderem autolog die kontralaterale Mamille teilen (*nipple sharing*). Da diese, genau wie die geformte und anschließend tätowierte Methode der Mamillenrekonstruktion nicht ein passgenaues Implantat ersetzt, bietet *Tissue Engineering* und der 3D-Biodruck hier viele Möglichkeiten. Für den Druck von Fettgewebsäquivalenten ist es möglich, adipozytäre Stammzellen mittels Laser-assistierten Biodruck dreidimensional zu drucken. Diese Form des 3D-Drucks beeinträchtigt die Zellen nicht

Literaturdiskussion

in ihrer Proliferations- oder Differenzierungsfähigkeit, die Zellen lassen sich sogar im Konstrukt noch zu Fettzellen differenzieren. Auch ließen sich die Zellen hier mittels des Laser-assistierten Biodrucks in einem Alginat-haltigen Gel kultivieren [60]. In einer Studie von Pati et al. wurden adipozytäre Stammzellen kultiviert und in einer dezellularen Tinte gedruckt. Als Stütze in den gedruckten Konstrukten wurde in einer Gitterform Polycaprolactone und die Biotinte inklusive Zellen gedruckt. Hierbei zeigte sich nicht nur ein Überleben, sondern auch ein Differenzieren der Zellen und des Konstruktes in Gewebe mit Fettgewebeeigenschaften [61]. Diese Gewebekonstrukte, bestehend aus der stützenden, künstlichen Tinte und der Tinte basierend auf dezellularisierter, extrazellulärer Matrix inklusive adipozytäre Stammzellen, zeigten auch *in vivo* fettgewebsartige Differenzierungsmuster und ließen sich noch nach 12 Wochen nachweisen. In einem weiteren Ansatz zum besseren Überleben der Zellen und einer suffizienten Prävascularisierung wurden poröse Brustimplantate in Versuchstiere implantiert, für zwei Wochen innerhalb des Versuchstiers mit Gefäßen angiogenisiert und anschließend Fettgewebe eingespritzt [62]. Hier zeigte sich vor allem in den Implantaten, in die zwei Wochen vor Einspritzen des Fettgewebes Gefäße eingesprossen waren, ein vermehrtes Überleben der Fettgewebszellen in der Mitte des dreidimensionalen Implantats. Insbesondere für Konstrukte mit größeren Volumen ist diese Methode vielversprechend.

Der 3D-Biodruck von prävascularisierten, patientenspezifischen Geweben ist nicht nur ein spannender Schritt für die Rekonstruktionschirurgie, sondern könnte auch im Bereich von *in vitro*-Krankheitsmodellen und Testung von Medikamenten Anklang finden [63]. So könnten dreidimensionale Konstrukte von Tumoren beispielsweise die Therapie besser und individueller vorhersagen als zweidimensionale Zellkulturversuche oder Tierexperimente [64].

Für den 3D-Druck von Fettgewebsäquivalenten gilt es also ein Zellüberleben und eine Differenzierungs- und Proliferationsfähigkeit der Zellen sicher zu stellen, indem eine ausreichende Nährstoffversorgung mittels Versorgungsstrukturen aufgebaut wird. Ebenso sollten die Vorteile des patientenspezifischen Konstrukts, also autologe Zellen und die genaue Passform, die mittels 3D-Biodruck festgelegt wird, in das Verfahren mit eingebracht werden.

2.8 STL-Files und G-Codes

Der dreidimensionale Druck beginnt mit dem Erstellen einer dreidimensionalen Struktur am Computer. Mittels sogenannter CAD (Computer Aided Design) können dreidimensionale Strukturen am PC erstellt werden [65]. Hierfür werden Programme benötigt, die im Folgenden kurz erläutert werden. Diese Programme speichern die Konstrukte in Form sogenannter STL-Files. STL steht für Stereolithographie: die Beschreibung dreidimensionaler Strukturen mittels mathematischer Formeln [66].

STL-Files sind Codes, anhand derer die Oberflächenstruktur eines dreidimensionalen Gebildes beschrieben wird. Obwohl sie die gängigste Variante im Speichern und Verbreiten von dreidimensionalen Strukturen sind, benötigen 3D-Drucker nicht nur die Oberflächenstruktur des Gebildes, sondern eine genaue Anweisung, wie sie das Konstrukt Schicht für Schicht drucken können. Hierzu werden die STL-Files in sogenannte G-Codes umgeschrieben, im Englischen bezeichnet als „*sliced*“, also „in Scheiben geschnitten“ [66]. So kann der 3D-Drucker die dreidimensionale Struktur Schicht für Schicht aufbauen. Ein G-Code ist ein zusammenhängender Text. Pro Zeile Code findet sich ein Befehl für den Drucker. Gelesen wird der G-Code von links nach rechts und von oben nach unten.

Während des 3D-Drucks bewegen 3D-Drucker eine Kartusche dem G-Code entsprechend in spezifischer Reihenfolge im dreidimensionalen Raum und drucken an den vorgegebenen Stellen Material heraus. Für den oben beschriebenen Extrusion-basierten 3D-Druck wird die Kartusche so dreidimensional bewegt und drückt in Abhängigkeit vom eingestellten Druck (im Folgenden *Pressure*) eine Tinte aus der Kartusche. Der Ausdruck „*Pressure*“ bezeichnet in dieser Arbeit durchgehend den eingestellten Druck, der auf die Kartusche wirkt. Die Geschwindigkeit, mit der die Tinte aus der Kartusche gedruckt wird, ist abhängig vom *Pressure*, unter dem die Kartusche steht, vom Querschnitt der Spitze, durch die die Tinte gedruckt wird und von der Tintenviskosität, die direkt mit der Tintentemperatur zusammenhängt.

2.9 Biotinten

Für den 3D-Druck von vitalen Strukturen sind unterschiedliche Biotinten beschrieben, die mittels verschiedener Techniken ausgehärtet werden können.

Literaturdiskussion

Während Alginat-haltige Biotinten mittels einer calciumhaltigen Lösung ausgehärtet werden können, härten kollagenhaltige Biotinten bei Raumtemperatur von selbst aus [67]. Biotinten auf Basis eines Gelatine- Methacrylat- Systems lassen sich mittels UV-Licht aushärten [68]. Außerdem können Matrigel [69], Fibrinogen [70] oder Polyethylen-Glykol [71] für den 3D-Biodruck verwendet werden. Da je nach Zelltyp und zu druckendem Gewebe unterschiedliche Anforderungen an die Biotinte gestellt werden, ist eine für alle Gewebe geeignete Standard-Biotinte noch nicht beschrieben. Fibrinogen beispielsweise kann für das Überleben von Endothelzellen von Vorteil sein [70]. Für die Implantation 3D gedruckter Konstrukte ist darauf zu achten, keine immunogen aktiven Substanzen innerhalb der Tinten zu verwenden. So müssen für die ideale Biotinte die biologischen Eigenschaften mit den Qualitäten, die einen suffizienten und guten 3D-Druck ermöglichen abgewogen werden.

Für diese Arbeit wurde mit dem *Inkredible+* 3D-Drucker der Firma *Cellink* gearbeitet. Für die Etablierung des 3D-Drucks bot es sich an, zu Beginn auch die Standardtinten der Firma *Cellink* zu verwenden. Diese sollen im Folgenden etwas ausführlicher betrachtet werden. Als Test-Tinte wurde das Hydrogel der Firma *Cellink*, *Cellink Start*, verwendet. Hiermit werden die G-Codes und Konstrukte ohne Zellbeimischung getestet, bevor die G-Codes mit dem Zell/Tintengemisch gedruckt werden. *Cellink Bioink* ist die Standardtinte der Firma *Cellink*. Gemäß Herstellerangaben ist hiermit das problemlose Drucken von Zellen aller Art möglich. In der *Bioink*-Tinte sind vor allem Alginate und nanofibrilläre Cellulose, die die natürliche extrazelluläre Matrix nachahmen sollen. Die genaue Zusammensetzung von *Cellink Bioink* ermöglicht einen suffizienten Druck, eine gewisse Formstabilität, eine gute Aushärtemöglichkeit sowie eine Biokompatibilität. So sind Chondrozyten innerhalb der Biotinte vital [72]. Die Viskosität dieser Tinte lässt es zu, dass man auch komplexe Strukturen drucken kann. *Cellink Bioink* lässt sich mithilfe einer *Ionic Binding Solution*, welche einer calciumhaltigen Lösung entspricht, aushärten. Die *Bioink* wird bei Raumtemperatur gedruckt. Eine weitere Tinte, *Gel Ma A*, ist eine Gelatine-basierte Tinte. Hier gibt es aus der Serie *Gel Ma* noch verschiedene andere Tinte. *Gel Ma A* wird ebenfalls für die meisten Zelltypen empfohlen. Es wird mit *Gel Ma A* gearbeitet, da sie sich mittels der Methylacrylate sowohl durch UV-Licht als auch durch Alginate mittels der *Ionic Binding Solution* binden lässt. So lassen sich alle in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte mittels der *Ionic Binding Solution* aushärten. Außerdem enthält *Gel Ma A* wenige andere Inhaltsstoffe, was die Abgrenzung von der *Cellink Bioink* erschwerte. Außerdem wurde eine Tinte

Literaturdiskussion

auf Basis von bovinem Kollagen I getestet. Hierin wiesen Tri-Kulturen der Fibroblasen, der adipose-derived Mesenchymal Stem Cells (adMSC) und der HDMEC eine Viabilität auf und Bi-Kulturen der Fibroblasten und Endothelzellen zeigten eine Prävasikularisierung [13, 73].

3. Zielsetzung

Für die rekonstruktive Brustchirurgie und die Transplantationsmedizin ist es notwendig, geeignetes, patientenspezifisches Gewebe herstellen zu können. Der 3D-Bio-druck ist hier ein möglicher Ansatz. Theoretisch lässt sich jedes Gewebe mithilfe des 3D-Druckers drucken. Die Einstellungen der Druck-Parameter sind allerdings sehr individuell von der Gewebeart und den verwendeten Zelltypen abhängig. Der Auswahl der Tinte kommt zum Aufbau des tragenden Gerüsts hierbei eine entscheidende Bedeutung zu.

Fibroblasten, mesenchymale Vorläuferzellen und Endothelzellen für die Gefäßversorgung stellen die Hauptzelltypen menschlichen Fett- und Bindegewebes dar, wie es in der Brust neben dem Drüsengewebe vorkommt. Isabel Brantsch konnte in ihrer Bachelorarbeit zeigen, dass sich diese Zellen sowohl in Mono-, als auch in Bi- und in Tri-Kultur kultivieren lassen [13]. Auch in einem dreidimensionalen Kollagen-Gel war die Zellviabilität nachzuweisen [13]. Für eine Bi-Kultur aus Fibroblasten und Endothelzellen konnte auch eine Viabilität innerhalb der beschriebenen Biotinten nachgewiesen werden [73]. Aufbauend auf den Ergebnissen der Arbeitsgruppe sollen mit Hilfe des 3D-Drucks Konstrukte mit den jeweiligen Zelltypen herstellen lassen, welche als funktionstüchtige, funktionelle Implantate Verwendung finden könnten. Es gilt herauszufinden, welche der beschriebenen Biotinten die besten Kulturbedingungen für die Zellen bieten und mit welchen Parametern der Druck optimal betrieben werden kann, sodass eine gefundene optimierte Tinten-/Zell-Kombination in einem standardisierten Proben-aufnehmer appliziert, d.h. „gedruckt“ werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wird mit einem *Inkredible+* 3D-Drucker der Firma *Cellink* gearbeitet. Für die verschiedenen Zelltypen des Brustfettgewebes sind verschiedene Tinten auf unterschiedlicher Basis beschrieben. Um zu untersuchen, welche der Tinten sich am besten zum Druck von vitalen Fibroblasten, adipozytären, mesenchymalen Stammzellen und Endothelzellen eignet, werden drei verschiedene Tinten getestet:

- Basierend auf Gelatine (*Gel Ma A*)
- Das Standardgel der Firma *Cellink* (*Cellink Bioink*)
- Basierend auf bovinem Kollagen I

Zielsetzung

Da in dem Labor bisher noch mit keiner der drei Zelltypen im 3D-Druck gearbeitet wurde gilt es herauszufinden, in welcher Tinte welcher Zelltyp am vitalsten ist und ob sich Viabilitätsunterschiede der Zellen in unterschiedlichen Biotinten zeigen.

Für das Drucken von Fibroblasten, Endothelzellen und mesenchymalen Stammzellen fehlt ein spezifisches Protokoll. Die Firma *Cellink* bietet zwar für das Drucken mit ihren Tinten allgemein gehaltene Protokolle an, jedoch keine spezifisch an die verwendeten Zelllinien und Tinten angepasste Erläuterungen. Auch für die Bi- und Tri-Kultur gibt es noch keine standardisierte Vorgehensweise. Diese Arbeit soll darauf abzielen, das 3D-Drucken von Zellen im Labor der Klinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit der Universität Mainz zu etablieren und geeignete Bedingungen für die Herstellung eines Fettgewebe-Äquivalents zu erarbeiten. Diese Arbeit stellt einen weiteren Schritt in Hinblick auf den Einsatz 3D-gedruckter prävascularisierter Brustfettgewebe-Äquivalente zur Rekonstruktion der Brust dar.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Chemikalien

Tabelle 1, verwendete Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller/Firma
2-Propanol	Carl Roth, Karlsruhe
Adenin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
<i>AlamarBlue</i> ®	Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA
Amphotericin B, 50 ng/ml	PeloBiotech, Planegg/Martinsried
Ampuwa für Spülzwecke Plastipur ®	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
bFGF	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Calciumchlorid Dihydrat	Merck, Darmstadt
<i>Cellink Bioink</i>	<i>CELLINK</i> ®, Boston, MA, USA
Cellovations ® Mesenchymal Stem Cell Basal Medium xeno-free, PB-C-BH-675-0511-XF	PeloBiotech, Planegg/Martinsried
Celltracker™ Green CMAC	Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA
Celltracker™ Red CMTPX	Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA
Choleratoxin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Coll 1	<i>CELLINK</i> ®, Boston, MA, USA
Crosslinking Solution	<i>Cellink</i> ®, Boston, MA, USA
Cultispher®-S Microcarrier	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dako REAL™ Antibody Diluent	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Dako REAL™ DAB+ Chromogen (X50)	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Dako REAL™ EnVision™ HRP RABBIT/MOUSE	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Dako REAL™ Substrate Buffer	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Destilliertes Wasser Ampuwa® Spüllösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dispase (von Bacillus polymyxa)	Gibco/Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA
Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium high glucose (DMEM)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dulbeccos` s Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco/Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA
Endothelial Cell Growth Medium 2 (ready-to-use)	PromoCell, Heidelberg
Endothelial Growth Factor (EGF)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol 96%	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol 96% denatured with IPA, MEK and Bitrex pure	AppliChem GmbH, itwReagents, Darmstadt

Material und Methoden

Ethanol 99% denatured with IPA, MEK and Bitrex pure	AppliChem GmbH, itwReagents, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco/Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA
<i>Gel Ma A</i>	CELLINK®, Boston, MA, USA
Gelatinepulver Typ B, from Bovine Skin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Gentamicin, 50 µg/ml	PeloBiotech, Planegg/Martinsried
Gentamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hepes Solution (1M)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
IBMX	PeloBiotech, Planegg/Martinsried
Indometacin	PeloBiotech, Planegg/Martinsried
Insulin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropylalkohol GMP	Hedinger, Stuttgart
Kollagenase Typ CLSII	Biochrom GmbH, Berlin
Medium 199 10x	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
MTT 0,5%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natrium Heparin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Oil Red O – Solution (O1391)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PeloBiotech Basal Medium	PeloBiotech, Planegg/Martinsried
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Thermo-fisher, Waltham, MA, USA
Prolong™ gold antifade reagent	Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Roti® Histokitt II	Carl Roth, Karlsruhe
Roti®-Histofix (4,5%)	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure (1 N)	Merck, Darmstadt
Soluble Kollagen (5 mg/ml)	Viscofan Bio Engineering, Weinheim
Sterilium classic pure	BODE Chemie GmbH, Hamburg
Supplement Kit (Supplement I – VI) für adipozyten Erhaltungsmedium, PB-C-MH-442-3699-M	PeloBiotech, Planegg/Martinsried
Supplement Kit (Supplements I – XV) für Adipozyten-Endothelzell Bi-Kulturmedium, PB-C-MH-442-3699-M	PeloBiotech, Planegg/Martinsried
Supplement Kit (Supplements I-VIII) für adipozyten differenzierungsmedium, PB-C-DH-442-3699	PeloBiotech, Planegg/Martinsried
Trypsin-EDTA (0,25 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Versene 1:5000 (1x)	Gibco/Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth, Karlsruhe

Material und Methoden

4.1.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2, verwendete Verbrauchsmaterialien.

Materialien	Hersteller
8-Well-Zellkulturkammern auf Glasobjektträgern, ablösbar	Sarstedt, Nümbrecht
BRANDplates® Elisaplatten pureGrade™	Brand, Wertheim
Cartridges (3 ml)	CELLINK®, Boston, MA, USA
Cellstar Cell Culture Plate (6-, 24- und 96-Well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
EASYstrainer Zellsieb 50 ml (100 µm, 70 µm)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Einmalhandschuhe Nitril Sempercare®	Semperit AG, Wien, Österreich
Einmalskalpell (Nr. 23)	FEATHER® Safety Razor Co. Ltd, Osaka, Japan
Einmalspritze Omnifix® Luer Lock Solo (3 ml)	Braun, Melsungen
Kryoröhrchen Cryogenic Tubes Nunc™	Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA
LUNA™ Cell Counting Slides	Logos Biosystems, Anyang, Südkorea
Multiple Well, 6 Well, Costar® Corning® CellBIND® Surface	Corning, NY, USA
Objektträger Menzel-Gläser Superfrost	ThermoScientific, Waltham, MA, USA
Pipettenspitzen Filter Tips, TipOne® (0,5-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl)	StarLab, Hamburg
Reaktionsgefäße (1 ml, 4 ml, 15 ml, 50 ml)	Eppendorf, Hamburg
Schülke Wipes 70% Ethanol	Safe&Easy, Norderstedt
Serologische Pipetten Cellstar® (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
SMI Spon Gelatineschwamm	SMI AG, St. Vith, Belgien
Sterile high-precision conical Bioprinting Nozzles (red 250 µm, blue 410 µm)	CELLINK®, Boston, MA, USA
TC-Flasche T75, Cell+, Bel. Kap.	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Weighing trays 609	Schleicher & Schuell, Dassel
Whatman™ Filter (100 µm, 0,2 µm)	GE Healthcare, Solingen
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen (100x20 mm, 30x10 mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

4.1.3. Gebrauchsmaterialien

Tabelle 3, verwendete Gebrauchsmaterialien.

Gebrauchsmaterialien	Hersteller
Cryo-Einfriergerät	Nalge Nunc Int., Rochester, New York, USA
Dako Pen	Dako, Hamburg
Female-to-Female Luer Lock Adapter	CELLINK®, Boston, MA, USA
Feuchtekammer	Aus eigener Werkstatt, Mainz
Gefrierbehälter CoolCell®	BioCision, Larkspur, Kalifornien, USA

Material und Methoden

Magnetrack	OZ Biosciences, Marseille, Frankreich
Mehrkanalpipette Transferpette® S-8 (10-100 µl, 20-200 µl)	Brand, Wertheim
Mikrochirurgisches Besteck	Aesculap, Braun, Tuttlingen
Pipettierhilfe, Accu-jet pro	Brand, Wertheim
Pipetten Eppendorf Research (0,5-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Racksysteme	Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA

4.1.4. Geräte

Tabelle 4, verwendete Geräte.

Geräte	Hersteller
3D-Drucker <i>Inkredibile+</i>	CELLINK®, Boston, MA, USA
Chiller Plate	Histo-Lab, Göteborg, Schweden
CO ₂ - Inkubator VIOS 160i	Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Eismaschine	Ziegra, Hannover
Gefrierschrank -20 °C	Bosch, Gerlingen
Gefrierschrank HERAFreeze™ -80 °C	Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA
Glomax® Multi+ Detection System	Promega, Walldorf
Kryo Stickstofftank Locator 6 Plus	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Kühlschrank 4 °C	Bosch, Gerlingen
Labor-Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Leica DFC450 C Mikroskopkamera	Leica, Wetzlar
LUNA™ Automated Cell Counter	Logos Biosystems, Anyang, Südkorea
Mikroskop Leica DMIL LED	Leica, Wetzlar
PC	©Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA
Schlittenmikrotom SM200R	Leica, Wetzlar
Schüttelgerät Hybrid Capture® System	Digene Corp., Gaithersburg, MD, USA
Sicherheitswerkbank HeraeusSafe	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Tissue Drying Oven TDO 60	Mediate, Burgdorf
Tissue-TE Thermal Dispensing und Kryo-Konsole	Miles Scientific, DE, USA
Tissue-TEK VIP Einbettautomaten	Miles Scientific, DES, USA
Vakuumpumpe Mini-Vac Power	PeqLab, Erlangen
Vortex Reax 1D	Heidolph, Schwabach
Wasserbad AquaLine AL18	Lauda, Lauda-Königshofen
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau

4.1.5. Lösungen und Puffer

Tabelle 5, verwendete Lösungen und Puffer.

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
Adenin-Lösung	1,215 g in 50 ml 0,2 M HCL bei 50° Lösen
Antikörper-Lösung	1:50 AK in Dako Antibodysolution

Material und Methoden

Block-Lösung	1% BSA in PBS
Dako Target Retrieval Solution, pH 9 (high puffer) (10x)	1:10 verdünnt in H ₂ O
CD34 & CD31 Bead-Isolationspuffer	PBS + 0,1% BSA
Choleratoxin-Lösung	0,5 mg Choleratoxin in H ₂ O gelöst um 200 µg/ml Stocklösung herzustellen, aufbewahrt bei 4° C
Dispase II-Lösung	Stammlösung von 24 U/ml in PBS Arbeitslösung von 2,4 U/ml verdünnt
EGF-Lösung	Lösen des Pulvers durch Zugabe von 1 ml H ₂ O und zu 19 ml H ₂ O hinzugeben
Einfriermedium: DMSO-Lösung	10% DMSO in FCS
Fixierlösung für Konstrukte	50 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O in Histofix 4,5%;
Lösung zum Lagern fixierter Konstrukte	50 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O in 0,9% NaCl
Hydrocortison-Lösung	1 mg in 200 µl 100% Ethanol lösen, dann 2,3 ml H ₂ O hinzugeben
Kollagenase II-Lösung	1 mg Kollagenase II in 1 ml Kollagenase II-Puffer
Kollagenase II-Puffer	3,9 g NaCl, 0,5 g KCl, 2,4 g HEPES (≅ etwa 0,01 Mol), 0,7 g CaCl ₂ 2H ₂ O, pH 7 einstellen, ad 1 l mit VE-Wasser
Solubilisierungspuffer	0,01 N HCL in 10% SDS

4.1.6. Medienzusätze

Tabelle 6, verwendete Medienzusätze.

Medienzusätze	Verdünnung
Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)	Stammlösung von 1,25 µg/ml: bFGF in sterilem TRIS-Puffer auf 25 µg/ml verdünnen, anschließend mit DPBS auf 1,25 µg/ml verdünnen. Stammlösung von 25 µg/ml in DPBS + 0,1 % BSA
Natrium-Heparin	Stammlösung von 50 mg/ml in sterilem Aqua dest. lösen
Cellovations® Mesenchymal Stem Cell Growth Supplement, xeno-free (PB-C-SH-675-0511-XF)	PeloBiotech, Planegg/Martinsried

4.1.7. Medien

Tabelle 7, verwendete Zellmedien.

Medium	Zusammensetzung
Adipozyten Differenzierungs-Medium (Cellovations Adipocyte Differentiation Medium Kit enhanced, defined)	500 ml Basal Medium + Supplement Kit (Supplements I-VIII) + Indometacin + IBMX + 50 ng/ml Amphotericin B + 50 µg/ml Gentamicin PB-C-DH-442-3699
Adipozyten-Erhaltungsmedium (Cellovations Adipocyte Maintenance Medium Kit enhanced, defined)	500 ml Basal-Medium + Supplement Kit (Supplement I – VI) + 50 ng/ml Amphotericin B + 50 µg /ml Gentamicin

Material und Methoden

	PB-C-MH-442-3699-M
adMSC Kultur-Medium (Cellovations® Mesenchymal Stem Cell Medium enhances, xeno-free)	500 ml Cellovations® Mesenchymal Stem Cell Basal Medium xeno-free (PB-C-BH-675-0511-XF) + 25 ml Cellovations® Mesenchymal Stem Cell Growth Supplement, xeno-free (PB-C-SH-675-0511-XF)
FAD-Medium	60 % DMEM + 30 % DMEM/HAM'S F12 + 9% FCS + 0,9 % P/S + 22 µg/ml Adenin-Lösung + 7,4 ng/ml Cholera-toxin-Lösung + 9 ng/ml EGF – Lösung + 36 ng/ml Hydrocortison-Lösung + 4,6 µg/ml Insulin-Lösung
Fibroblasten-Medium	500 ml DMEM + 10 % FCS + 1 % P/S
HDMEC-Medium	500 ml Endothelial Cell Growth Media 2 + 15 % FCS + 1 % P/S + 0,2 % bFGF + 0,04 % Natrium Heparin + 2 % HEPES

4.1.8. Microbeads

Tabelle 8, verwendete Microbeads.

Microbeads	Bestellnummer	Hersteller	Verwendung
Dynabeads® CD31 Endothelial Cell	11155D	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA	Zellisolation
Dynabeads® CD34 Positive Isolation Kit	11301D	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA	Zellisolation

4.1.9. Zellen und Gewebeproben

Tabelle 9, Zellen und Gewebeproben.

Zelltyp	Spendergewebe	Standort
Adipose mesenchymale Stammzellen	Brust- und Bauchfettgewebe	Überschussgewebe der Gynäkologie, Universitätsmedizin Mainz
Endothelzellen (HDMEC)	Vorhaut	Überschussgewebe der Urologie, Universitätsmedizin Mainz
Fibroblasten	Mundschleimhaut	Überschussgewebe der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Universitätsmedizin Mainz
Human Adipose Tissue-derived mesenchymal Stem Cells	Cat#: PB-CH-642-0511	PeloBiotech GmbH, Plannegg/Martinsried

Material und Methoden

4.1.10. Antikörper

Tabelle 10, Antikörper.

Antikörper	Spezies	Klon	Bestellnummer	Hersteller
Anti CD31	Maus	JC7OA	20055151	Dako
Anti CD34	Maus	QBEnd 10	20027337	Dako

4.2. Software

Tabelle 11, Softwareeinstellungen.

Programm	Version	Hersteller
Cellink Heartware	≅ nahezu Repetier Host 2.1.6.	Cellink
EndNote X9	X9	Alfsoft GmbH, Frankfurt am Main
ImageJ	1.48a	Wayne Rasband, USA
Las	4.9	Leica Microsystems, Wetz- lar
PC	Windows 7 Professional Service Pack 1 Prozessor: Intel(R) Pen- tium(R) CPU G640 @2.80 GHz Installierter Arbeitsspeicher (RAM): 4,00 GB (3,85 GB verwendbar) Systemtyp: 64 Bit-Betriebs- system	©Microsoft Corporation, alle Rechte vorbehalten, Redmont, Washington USA
Repetier Host	2.1.6	Hot-World GmbH & Co. KG, Willich
Reprap.org	Page Version ID 188061	RepRap contributors, Da- tum der letzten Revision: 19. Juni 2020, 9:30 Uhr
Slicer	1.3.1 dev.	Copyright©2011-2017 Ales- sandro Ranellucci. Slic3r is licensed under the GNU Affero General Public License, version 3.
TinkerCAD	„tinkercad.com“/dashboard	© 2020 Autodesk, Inc. All Rights Reserved
Word, Excel, PowerPoint	Office365	©Microsoft 2020, Redmont, Washington, USA

Material und Methoden

4.3. Methoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer sterilen Werkbank bzw. im 3D-Drucker, der ebenfalls einen HEPA-Filter vorweist, vollzogen. Die Inkubation der Zellen und der Experimente erfolgte im CO₂-Inkubator bei 37° C und 5% CO₂.

4.3.1. Zellisolation

4.3.1.1. *Fibroblasten*

Die Isolation von Fibroblasten erfolgte aus Mundschleimhautpräparaten aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Die Präparate wurden vom Chirurgen in ein Reaktionsgefäß mit DMEM-Medium gegeben.

Das Medium wurde entfernt. Das verbleibende Mundschleimhautgewebe wurde zweimalig mit 70 % Ethanol und zweimalig mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Präparat in 10 ml PBS gegeben und die Flüssigkeit zusammen mit dem Gewebe in den Deckel einer Petrischale gegeben.

In diesem Deckel wurde das Mundschleimhautgewebe nun mit einer Pinzette und einem Skalpell in möglichst kleine (< 1 mm) Stücke geschnitten. Diese wurden zu je 4-6 Stück in ein Well einer Corning® cell-binding 6-Well-Platte gegeben und etwa 15 min antrocknen gelassen. Anschließend erfolgte die vorsichtige Zugabe von FAD-Medium.

Es wurde nach 4-5 Tagen visuell kontrolliert, ob und welche Zellen aus dem Stück Mundschleimhaut ausgewachsen sind. Im Anschluss erfolgte die Selektion von Fibroblasten mittels der Umstellung auf Fibroblasten-Medium. Der Medienwechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

4.3.1.2. *Isolation und Differenzierung von Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells*

Die Isolierung von adipösen mesenchymalen Stammzellen (adMSC) erfolgte aus Fettgewebeproben aus Brust oder Abdomen aus dem gynäkologischen Operationssaal. Die Gewebeproben wurden vom Chirurgen in ein Reaktionsgefäß mit DMEM-Medium gegeben.

Material und Methoden

Das Medium wurde verworfen. Die Gewebeproben wurden zweimalig mit 70 % Ethanol und zweimal mit PBS gewaschen. In einer Petrischale wurden 5 – 10 ml Kollagenase II-Lösung vorgelegt und die Fettgewebeproben hinzugegeben. Mit einer Pinzette wurden die Gewebeproben anschließend in kleine Stücke gezupft. Die Gewebestücke wurden mitsamt der Kollagenase II-Lösung in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 min in den Inkubator gestellt. Das Reaktionsgefäß wurde alle 5 min geschwenkt. Nach der halben Stunde wurde die Kollagenase II-Lösung mitsamt den Fettgewebestücken durch ein 100 µm Sieb filtriert. Mittels 10 ml PBS + 10 % FCS wurde das Reaktionsgefäß ausgespült und die entstandene Suspension erneut durch den Filter gegeben.

Das Filtrat wurde für zehn min zum Sedimentieren aufrecht hingestellt. Nach 10 min wurde die lipophile Phase in ein zweites Reaktionsgefäß überführt. Beide Reaktionsgefäße wurden für fünf min bei 400 G und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, beide Pellets wurden in je 5 ml PBS + 10 % FCS resuspendiert und gepoolt. Anschließend wurde die Suspension erneut fünf min bei 400 G und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 10 ml PBS + 10 % FCS resuspendiert und die entstandene Suspension erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 5 ml Fibroblastenmedium resuspendiert und die Zellsuspension in eine 25-cm²-Zellkulturflasche überführt. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

Bead-Isolierung adMSC

Die Bead-Isolierung erfolgte mit CD34-Dynabeads® im Magnetrack. adMSC exprimieren CD34 in einem frühen Stadium auf ihrer Oberfläche [74]. Die CD34-Dynabeads® sind mit Eisen beladene Antikörper, die an CD34-Oberflächenmoleküle der Zellen binden können. Die Isolierung erfolgt anhand der magnetischen Eigenschaften der gebundenen Dynabeads®. Die CD34-Bead-Isolierung erfolgte versuchsweise direkt bei der Isolierung aus dem Gewebe oder 1-2 Tage nach der Isolierung der Zellen aus den Fettgewebeproben.

Bei einer Bead-Isolation nach 1-2 Kulturtagen wurden die Zellen mit Trypsin aus der Zellkulturflasche herausgelöst und in einem 15 ml-Reaktionsgefäß für 5 min bei 300 G und Raumtemperatur zentrifugiert. 20 µl der Bead-Suspension wurden in 10 ml PBS + 0,1 % BSA aufgenommen. Die Bead-Suspension wurde für 1 Minute in das Magnetrack gestellt. Die PBS + 0,1 % BSA-Lösung wurde abgenommen und die Beads in

Material und Methoden

frischen 10 ml PBS + 0,1% BSA aufgenommen. Das Zellpellet wurde in der Suspension mit den Dynabeads® resuspendiert und für 15 min bei 4° C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für 3 min in den Magnetrack gestellt. Die überschüssige PBS-Lösung wurde abgenommen, 10 ml frisches PBS dazugegeben, geschüttelt und für weitere 3 min in das Magnetrack gestellt. Insgesamt wurde die Probe dreimal 3 min in das Magnetrack gestellt und das PBS ausgetauscht. Anschließend wurden die Beads mit den an ihnen gebundenen Zellen mit 5 ml Fibroblastenmedium resuspendiert und in eine neue 25-cm²-Zellkulturflasche gegeben.

Für den Versuchsansatz zur Überprüfung der Bead-Isolierung wurde das resuspendierte Pellet nach der Isolation aus dem Fettgewebe vor der Bead-Isolierung 2:1 geteilt. Zwei Teile wurden Bead-isoliert und ein Teil wurde direkt in eine frische 25-cm²-Zellkulturflasche überführt. Bei der Bead-isolierten Gruppe wurde der erste Überstand abgenommen, bei 300 G und Raumtemperatur fünf min zentrifugiert und ebenfalls in einer eigenen 25-cm²-Zellkulturflasche kultiviert.

Differenzierung zu Adipozyten

Die Differenzierung der adMSC zu Adipozyten erfolgte, wenn die Zellkulturflasche zu 80% konfluent bewachsen war. Hierfür wurde die Zellkultur einmalig mit PBS gewaschen und anschließend für etwa 14-20 Tage auf Adipozyten Differenzierungsmedium umgestellt. Sobald die Zellen sichtbare Vesikel ausbildeten, erfolgte die Umstellung auf Adipozyten-Erhaltungsmedium.

Oil Red O Färbung

Für die Kontrolle der Adipozytendifferenzierung wurden nach Umstellung auf Adipozyten-Differenzierungsmedium und die mikroskopische Sichtbarkeit von Fettvesikeln auf Adipozyten-Erhaltungsmedium umgestellt. Die Zellen wurden aus den Zellkulturflaschen mit *Versene* gelöst und in 8-Kammer-Objektträger ausgesät. Nach 2-4 Tagen wurde das Medium abgenommen und die Kammern mit Histofix 4,5 % bedeckt. Nach einer halben Stunde Inkubation bei 4 °C wurde das Histofix entfernt und die Zellen mit PBS dreimalig gewaschen.

Die Kammern wurden dreimalig mit destilliertem Wasser und einmalig mit *iso*-Propanol gespült und mit *Oil Red O*-Färbelösung für 30 min bedeckt. *Oil Red O* ist ein lipophiler

Material und Methoden

Farbstoff, der zur Anfärbung von Fettvesikeln innerhalb von Zellen angewandt werden kann. Die *Oil Red O*-Lösung wurde abgeklopft und die Kammern von den Objektträgern gelöst. Die Objektträger wurden kurz mit *iso*-Propanol gespült und dann für 10 min in Hämatoxylin gefärbt. Anschließend wurden die Objektträger 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Die Objekte wurden mit „Prolong™ Gold antifade reagent“ und Deckgläsern eingedeckelt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Am Folgetag wurden die Objektträger mit dem Leica DM IL LED-Mikroskop betrachtet und fotografiert.

CD34-Immuncytochemie

Die aus dem Fettgewebe isolierten Zellen, genau wie die schon mit Differenzierungsmedium behandelten adMSC, wurden für die CD34-Immuncytochemie wie oben beschrieben in 8-Kammerobjektträger ausgesät. Nach 2-4 Tagen Kultivierung auf den Objektträgern wurde das Zellmedium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gespült und danach mit 200 µl Histofix 4,5 % für 30 min bei 4° fixiert. Anschließend wurde das Histofix abgenommen, die Kammern dreimal mit PBS gespült und bei Raumtemperatur gelagert.

Für die Färbung wurden die Kammern für 10 min mit PBS hydratisiert. Danach wurden für 10 min mittels 3 % H₂O₂ die endogenen Peroxidasen geblockt. Die Kammern wurden einmalig mit destilliertem Wasser und einmalig mit PBS gespült und für 1 h mit PBS + 1 % BSA zum Verhindern der unspezifischen Bindungen bedeckt. Die PBS + 1 % BSA-Lösung wurde abgeklopft und die Kammern mit Antikörperlösung bedeckt. Die Inkubation mit dem CD34-Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C mit 100 µl einer 1:50 verdünnten Antikörperlösung. Die Präparate wurden anschließend dreimal 2 min mit PBS gespült. Danach wurde für 30 min mittels DaKo-REAL-EnVision-HRP beimpft und erneut dreimal 2 min mit PBS gespült. Anschließend erfolgte 4-6 min die DAB⁺-Chromogenfärbung mit 1:50 in Substratpuffer verdünntem DAB⁺-Chromogen. Die Präparate wurden dreimal 2 min mit VE-Wasser gespült und anschließend für 20 min mit Mayers Hämalaun gefärbt. Die Präparate wurden für 10 min mit Leitungswasser gespült und in aufsteigender Alkoholreihe entwässert, indem die Objektträger kurz in destilliertes Wasser, kurz in 70 % Ethanol, zwei min in 96 % Ethanol, zweimal 3 min in *iso*-Propanol und dreimal 5 min in Xylol gestellt wurden. Mit Roti® Histokitt II wurden die Präparate eingedeckelt.

Material und Methoden

4.3.1.3. *Human Dermal Microvascular Endothelial Cells (HDMEC)*

Die Isolierung der *Human Dermal Microvascular Endothelial Cells* (HDMEC) erfolgte aus Vorhäuten als Überschussmaterial bei Circumcision aus dem Operationssaal der Urologie. Die Präparate wurden vom Chirurgen in ein Gefäß mit DMEM-Medium gegeben.

Die Probe wurde zweimalig für 30 Sekunden mit 70 % Ethanol und zweimalig mit PBS gewaschen. Anschließend wurde sie in 5-10 ml PBS in einer Petrischale gegeben und mit einer Pinzette und einer Schere das überschüssige Bindegewebe entfernt. Mit einer Pinzette und einem Skalpell wurde die Vorhaut dann in kleine Stücke (3x3 mm) geschnitten und in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde mit 9,9 ml PBS und 100 µl 2,4 U/ml Dispase II überdeckt und über Nacht unter stetigem Schütteln bei 4 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Probe zweimalig mit PBS gewaschen. Mit einer Pinzette und einem Skalpell wurde das Epithel der Vorhautstücke abgekratzt. Danach wurden die Gewebestückchen in 5 ml 1 mg/ml Kollagenase II-Lösung überführt und für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach der einstündigen Inkubation wurden die Gewebestückchen zusammen mit 10 ml FCS in eine Petrischale überführt und für 10 min zermörst. Die entstandene Flüssigkeit wurde durch ein 100 µm-Sieb in ein 50 ml-Reaktionsgefäß filtriert und die Petrischale mit so viel PBS nachgespült, dass im neuen Reaktionsgefäß 50 ml Zellsuspension waren. Dieses wurde für 5 min mit 300 G zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das Zellpellet wurde in 30 ml PBS resuspendiert. Das Reaktionsgefäß wurde wieder für 5 min bei 300 G zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 5 ml HDMEC-Medium resuspendiert und in einer beschichteten 75cm²-Zellkulturflasche bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zur Bead-Isolation inkubiert.

Bei der Isolation von HDMEC aus Vorhäuten werden unvermeidbar Fibroblasten mit-isoliert. Sobald unter lichtmikroskopischer Kontrolle genügend Endothelzellen sichtbar waren, wurden die Zellen aus der Zellkulturflasche herausgelöst, zentrifugiert und mittels CD31-Dynabeads® von Fibroblasten isoliert. Hierfür wurden 10 µl CD31-Dynabead-Stammlösung in 10 ml PBS + 0,1 % BSA aufgenommen und das entstandene Zellpellet hiermit resuspendiert. Die Probe wurde für 15 min unter stetigem Schütteln bei 4 °C inkubiert. Das 15 ml-Reaktionsgefäß wurde nach der Kühlinkubation für 3 min

Material und Methoden

in das Magnetrack gestellt. Der Überstand wurde vorsichtig abgesogen, frische 10 ml PBS darauf gegeben und geschüttelt. Dies geschah, wie auch bei den adMSC beschrieben, dreimalig. Beim dritten Isolationsschritt wurden die Zellen mitsamt der Dynabeads® in HDMEC-Medium resuspendiert und in einer mit Gelatine beschichteten 25 cm²-Zellkulturflasche ausgesät. Der Medienwechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

Die nach der Bead-Isolation verwendeten Zellkulturflaschen wurden im Vorhinein mit Gelatine beschichtet. Hierfür wurden 2 mg/ml Gelatinepulver in PBS gelöst und steril filtriert. 5 ml der Gelatinelösung wurden in eine 75 cm²-Zellkulturflasche gegeben und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde die Gelatinelösung abgenommen, die Zellkulturflasche bis zur Verwendung mit PBS bedeckt und bei 37 °C gelagert.

4.3.2. Zellkultur

4.3.2.1. Ablösen und Splitten von Zellen

Zellen wurden mittel Trypsin-EDTA aus der Zellkulturflasche gelöst, anhand folgender Mengen Standards

Tabelle 12, Menge des zum Ablösen benötigten Trypsins in Abhängigkeit von der Größe der Zellkulturflasche.

25 cm ²	0,5 ml Trypsin EDTA
75 cm ²	1 ml Trypsin EDTA
175 cm ²	2 ml Trypsin EDTA

Die Zellen wurden aus der Zellkulturflasche herausgelöst, wenn nach mikroskopischer Kontrolle etwa 80-100 % Konfluenz bestand. Für die Weiterverwendung wurden die Zellen in einem bestimmten Verhältnis geteilt und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Für das Ablösen der differenzierten adMSC wurde versuchsweise Versene anhand derselben Mengenstandards verwendet.

4.3.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Cryokonservieren von Zellen erfolgt das Einfrieren in Einfriermedium, bestehend aus FCS + 10 % DMSO. Die Zellen wurden aus der Zellkulturflasche gelöst. Die Trypsinreaktion wurde nach optischer Kontrolle, dass die Zellen gelöst sind, mittels

Material und Methoden

Zellkulturmedium gestoppt und die Zellsuspension in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde 5 min bei Raumtemperatur und 300 G zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei einer vollgewachsenen 75 cm²-Zellkulturflasche in 2-6 ml Einfriermedium suspendiert. Anschließend wurden je 1,5 ml der Suspension des Zell-Einfriermediums in insgesamt 2 bis 4 Einfrier-Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden in einen CoolCell® Zelleinfriercontainer überführt und für mindestens 24 h im -80 °C-Gefrierschrank eingefroren. Danach konnten die Einfrier-Reaktionsgefäße, in die mit flüssigem Stickstoff gekühlten Kühlkammern überführt werden.

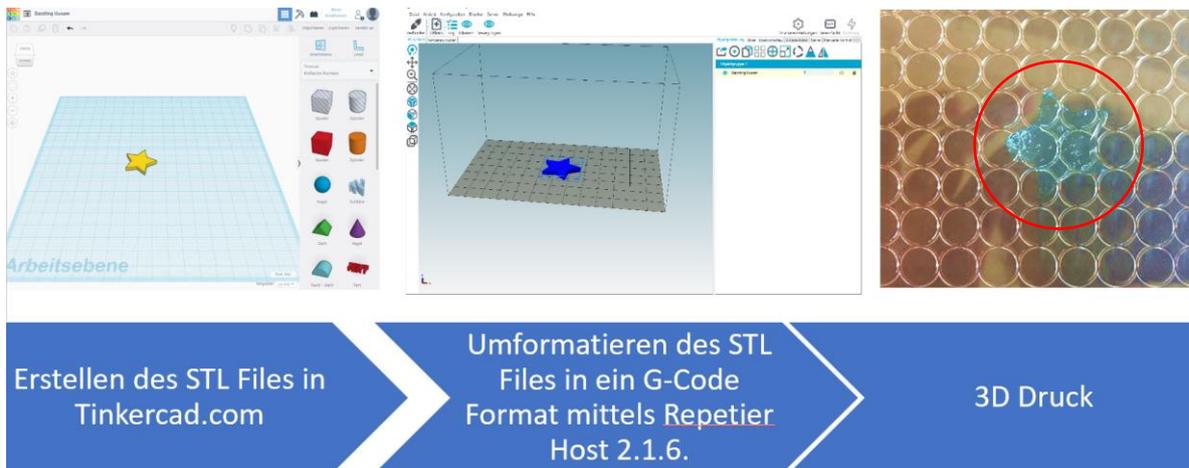
Für das Auftauen wurden die Einfrier-Reaktionsgefäße aus der Kühlkammer, bzw. dem -80° Gefrierschrank herausgenommen. Nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension in etwa 6 ml Zellkulturmedium aufgenommen und 5 min bei Raumtemperatur und 300 G zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Zellkulturmedium suspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine 75-cm²-Zellkulturflasche überführt und der Inhalt der Zellkulturflasche auf 12 ml aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Überführung in den Brutschrank.

4.3.3. Bedienung des 3D-Biodruckers

4.3.3.1. *Erstellung und Druck dreidimensionaler Teststrukturen*

Mittels der Website „tinkercad.com“ wurde virtuelle dreidimensionale Strukturen erstellt (Grafik 3, links). Diese wurden mit dem Programm *Slic3r* der Repetier Host 2.1.6 Software in druckfertige G-Codes umgeschrieben (Grafik 3, Mitte). Es wurde eine mit Tinte gefüllte Kartusche in den Drucker eingesetzt und unten beschriebenes Schema zur Kalibrierung des Druckers durchgeführt. Anschließend wurde der G-Code direkt über die Repetier Host Software ausgedruckt (Grafik 3, rechts).

Material und Methoden



Grafik 3, Ablauf der Erstellung und des Drucks dreidimensionaler Strukturen. Links im Bild: Screenshot der Website „tinkercad.com“; mittig Screenshot der Repetier Host Software; rechts im Bild: ein ausgedruckter Stern.

Material und Methoden

4.3.3.2. Befehle für das Erstellen von G-Codes

Die wichtigsten G-Code-Befehle sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13, wichtigste Codes für das Erstellen von G-Codes.[75]

Movement commands	
G0	rapid linear move
G1	linear move
G4 PX, SX	Pause vor X milliseconds, for X seconds
X	move in X-direction
Y	move in Y-direction
Z	move in Z direction
F	Set speed for movement
Calibration commands	
G21	Set units to millimeter
G90	use absolute coordinates
G91	Incremental positioning
G92	Set new start position
M82	Set extruder to absolute position
M83	Set extruder to relativ position
M84	disable motors
M104	Set extruder Temperature
M109	Set extruder Temperature and wait for it to be reached
M750	home printheads
M751	place PH1 to active position
M752	place PH2 to active position
M753	retract PH1 and PH2 to enable LED
M760	opens the valve for PH1
M761	closes the valve for PH1
M762	opens the valve for PH2
M763	closes the valve for PH2
M764	turns on the UV LED
M765	Turns off the UV LED

4.3.3.3. Erstellen von G-Codes

Da die vom Hersteller mitgelieferten G-Codes für das Drucken in den verwendeten Well-Platten nicht ideal waren, wurden die G-Codes mithilfe der Repetier-Host Software angepasst.

Die verwendeten G-Codes sind nach dem folgenden Schema aufgebaut:

1. Ansteuern des Wells, in das gedruckt werden soll
2. Einfahren in das Well
3. Drucken des Konstrukts

Material und Methoden

4. Herausfahren aus dem Well und Bewegung in das nächste Well.

Beispielhaft hier für das Erstellen von 2x2 mm Quadraten in eine 96-Well-Platte:

Tabelle 14, Anleitung zum Erstellen eines kleinen Quadrats in ein Well einer 96-Well-Platte.

	Befehl	Druckerausführung
	G21 G90	Die Befehle werden in mm und in absoluten Einheiten umgesetzt
Schritt 1	G0 X-49 Y-34.8	Der Drucker steuert das H1 Well an.
	G92 X0 Y0	Die Position über dem H1 Well wird als neuer Startpunkt festgelegt.
Schritt 2	G1 Z0.3 F500	Der Drucker fährt in das H1 Well hinein und bleibt auf einer Höhe von 0,3 mm stehen. Hinter dem Buchstaben „F“ erfährt der Drucker, wie schnell er den Druckkopf für die folgenden G1 Befehle bewegen soll. F500 bedeutet, dass der Drucker mit einer Geschwindigkeit von ca. 500 mm/min den Druckkopf bewegt.
Schritt 3	M760	Die Verschlusskappe des ersten Druckkopfes (PH1) wird geöffnet.
	G1 X1 G1 Y1 G1 X-1 G1 Y-1 G1 X1 Y-1 G1 Y0	Der Drucker fährt ein Quadrat. 
	M761	Die Verschlusskappe des ersten Druckkopfes (PH1) schließt sich.
	G1 Z0.6 bzw. G1 Z0.9	Der Drucker fährt auf die Höhen, auf denen er das kleine Quadrat nochmal drucken kann. So entsteht ein mehrlagiges Konstrukt.
Schritt 4	G1 Z20	Der Drucker fährt wieder aus dem Well hinaus.
	G0 X8.99 bzw. G0 Y8.99	Der Drucker fährt ein Well nach rechts (x-Richtung), bzw. nach hinten (y-Richtung).
	G92 X0 Y0	Das nächste Well wird als neuer Startpunkt festgelegt.

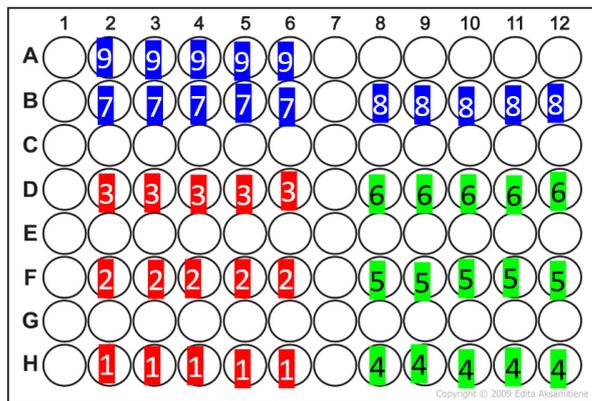
In der Mitte des gedruckten Quadrates blieb ein 1 mm großes Loch. Zum Abschluss des Drucks wurde dem Drucker befohlen, mithilfe des Befehls G1 Z15 nach oben zu fahren und der Druck endet. Zuletzt wurde dem Drucker noch befohlen, auf die ursprünglichen X=0 und Y=0 Werte zurückzufahren und dieses als Startpunkt mittels „G92 X0 Y0“ festgelegt. Die Entfernungen zum Erreichen des ursprünglichen X=0 und Y=0 Wertes wurden nach Ende des Drucks errechnet und in den G-Code eingefügt.

Es wurde stets darauf geachtet, dass der Drucker für das Drucken der Dateien nicht zu viel Zeit benötigt. Die G-Codes des Herstellers wurden dementsprechend verändert. Für das Drucken wurde eine Geschwindigkeit von 500 mm/min (G1 ... F500) definiert, hierbei gibt die Zahl hinter dem Befehl „F“ die Geschwindigkeit in mm/min an, mit der der Druckkopf sich bewegt. Hinter den Befehl „G1“ steht in derselben Zeile der Ortsbefehl, zu dem der Drucker fährt. Für das Wechseln zwischen den Wells wurde die Geschwindigkeit auf 1500 mm/min oder 2000 mm/min (G0 ... F1500) aufgestockt.

4.3.3.3.1. Erstellung von G-Codes für 96-Well-Platten

In einem ersten Versuchsansatz wurde lediglich eine Lage des oben beschriebenen Quadrats in 5 Wells gedruckt. Da nur sehr kleine Konstrukte entstanden, wurde der G-Code zu mehrlagigen Konstrukten verändert.

Die G-Codes für die Zellviabilitätsversuche in 96-Well-Platten sollten bewerkstelligen, dass auf eine 96-Well-Platte je 5 Konstrukte des kleinen (2 Layers), des mittelgroßen (4 Layers) und des großen (6 Layers) Konstrukts gedruckt werden konnten und dies in drei unterschiedlichen Ansätzen (1×10^6 , 2×10^6 und 0 Zellen pro ml). Es wurden also mit 10^6 Zellen pro ml Gel die Wells H2-H6 mit einem kleinen Konstrukt, die Wells F2-F6 mit einem mittelgroßen Konstrukt und die Wells D2-D6 mit einem großen Konstrukt bedruckt. Mit 2×10^6 Zellen/ml Gel wurden die Wells H8-12 mit einem kleinen Konstrukt, die Wells F8-F12 mit einem mittelgroßen und die Wells D8-D12 mit einem großen Konstrukt bedruckt. Als Leerkontrollen (0 Zellen/ml Gel) wurden die Wells B2-B6 mit einem kleinen Konstrukt, die Wells B8-B12 mit einem mittelgroßen und die Wells A2-A6 mit einem großen Konstrukt bedruckt (Grafik 4).



Drucken von Quadraten in
verschiedener Schichthöhe (2 Layers, 4
Layers, 6 Layers)

Drucken mit verschiedenen
Zellkonzentrationen (10^6 Zellen/ml,
 2×10^6 Zellen/ml, 0 Zellen/ml)

Kleines Konstrukt, 10^6 Zellen/ml

Mittleres Konstrukt, 10^6 Zellen/ml

Großes Konstrukt, 10^6 Zellen/ml

Kleines Konstrukt, 2×10^6 Zellen/ml

Mittleres Konstrukt, 2×10^6
Zellen/ml

Großes Konstrukt, 2×10^6 Zellen/ml

Kleines Konstrukt, 0 Zellen/ml

Mittleres Konstrukt, 0 Zellen/ml

Großes Konstrukt, 0 Zellen/ml

Grafik 4, Versuchsaufbau für die Zellviabilitätsversuche.

- 1×10^6 Zellen/ml, in kleinem (1), mittleren (2) und großem (3) Konstrukt - Rot
- 2×10^6 Zellen/ml in kleinem (4), mittleren (5) und großem (6) Konstrukt - Grün.
- die Leerkontrolle in kleinen (7), mittleren (8) und großem (9) Konstrukt – Blau.

Es wurde das Quadrat, welches oben beschrieben ist, für die Zellviabilitätsversuche in Monokultur benutzt. Das kleine Quadrat wurde mit 3 mm Höhenabstand für die kleinen Konstrukte zwei Mal, für die mittleren vier Mal und für die großen sechs Mal gedruckt. Die so gedruckten Konstrukte wiesen die Form eines kleinen Kubus auf.

4.3.3.3.2. Erstellen von G-Codes für 24-Well-Platten

Für weitere Versuche wurde der G-Code aus den Dateien des Herstellers für das Drucken von zweilagigen Gittern in den verwendeten 24-Well-Platten angepasst, da die Dateien des Herstellers auf andere Wellplatten als die verwendeten angepasst waren und zum Teil umständliche Befehle im G-Code beinhalteten. Die Abstände zwischen den Wells wurden auf die verwendeten Well-Platten eingestellt (19,5 mm anstatt 18,6 mm). Die Geschwindigkeit des Druckkopfs für das Wechseln zwischen den einzelnen Platten wurde erhöht, indem der *post-structure*-Befehl „G0 Z40“, der nach dem Drucken jedes Gitters das Herausfahren des Druckkopfs aus dem Well bewirkt, in den Befehl „G0 Z25 F1500“ geändert wurde. Hiermit fuhr der Drucker anstatt 40 mm nur 25 mm aus den Wells heraus. Mit „F1500“ wurde für die folgenden G0-Bewegungen

Material und Methoden

die Geschwindigkeit von 1500 mm/min definiert. Es wurde weiterhin die Geschwindigkeit für den Druck im *pre-structure*-Code wieder auf etwa „F500“ zurückgesetzt. Aus den veränderten G-Codes für die ganze Well-Platte wurden kleinere Teilstücke erstellt, die das Drucken von einzelnen Reihen einer Well-Platte ermöglichen.

4.3.3.4. *Drucker-Steuerung direkt vom PC*

Nachdem zu Beginn der Arbeit noch von der SD-Karte und damit vom Bedienfeld des Druckers gedruckt wurde, wurde für die späteren Drucke die Software „Repetier-Host-2.1.6“ auf dem PC installiert und damit der Drucker vom PC gesteuert. Der Drucker wurde anhand des Protokolls mit dem PC verbunden und die Software auf dem PC installiert. Die verwendeten Standardeinstellungen sind auf der *Cellink*-Internetseite zu finden [76]. Mithilfe der Software konnten unter dem Panel „Manuelle Kontrolle“ dem Drucker direkt Befehle vom PC gegeben werden. Die Befehle, die in die Befehlszeile eingegeben werden, sind dieselbe G-Code Befehle, wie in Tabelle 12 festgehalten. Die wichtigsten G-Codes wurden dennoch auf die SD-Karte überspielt, sodass sowohl vom PC als auch vom Drucker gedruckt werden konnte¹.

4.3.3.5. *Inklusion des zweiten Druckkopfes*

Mit dem *Inkredible+* 3D-Drucker lassen sich simultan zwei Druckköpfe benutzen. Im Folgenden ist die Erstellung eines G-Codes, der beide Druckköpfe benutzt, beschrieben.

Die Spitzen zweier eingesetzter Kartuschen hatten einen Abstand von 35 mm in der x Richtung. Für den Wechsel von Druckkopf 1 (PH1) zu Druckkopf 2 (PH2) wurden die Druckköpfe nach oben gefahren, 35 mm nach links bewegt (G0 X-35) und PH2 mit „M752“ in die aktive Position gestellt. Die Position wurde mittels „G92 X“ als neuer Startpunkt markiert. Anschließend wird weiterer Code mit dem zweiten Druckkopf abgedruckt. Um wieder zum PH1 zu wechseln wurden die Druckköpfe wieder in z-Richtung nach oben gefahren und mit dem Befehl „G0 X35“, „G92 X0“ und „M751“ der erste Druckkopf wieder in die aktive Position gebracht.

¹ Da die benötigten Upgrades der „Repetier Host“ Software zur Druckersteuerung auf dem PC installiert werden mussten, es sich aber um Freeware aus dem Internet handelte, wurde im Laufe der Arbeit hauptsächlich von der SD-Karte gedruckt. Mit der Software des Herstellers ließ sich der Drucker vom PC aus bedienen, die erstellten G-Codes aber nicht innerhalb des Programmes abbilden. Mit der Freeware aus dem Internet ließen sich die G-Codes abbilden, aber der Drucker nicht über den PC steuern. Freeware aus dem Internet konnte auf dem PC nicht installiert werden, da hier Zugang zum Kliniksserver gegeben war und das Risiko eines Malware Downloads zu hoch war.

Material und Methoden

Für das Drucken von Schichten, die keinen direkten Kontakt zum Boden oder darunterliegenden Schichten haben, wurde zum Abschluss jeder Reisebewegung eine 200-500 ms dauernde Pause codiert, sodass sich die Tinte von der Spitze lösen konnte.

4.3.4. Druckvorgang

Vor jedem Druck wurde der Raum im 3D-Drucker sterilisiert. Dies erfolgte entsprechend der Angaben des Herstellers durch die eingebaute 365 nm UV-Lampe und die Einstellung des „Airflow“ auf die Einheit 100 für 5 min.

Vor Beginn des Drucks wurde folgende Schrittsequenz beachtet.

1. Unter „prepare bioprint“ wurde die Funktion „home axis“ gewählt.
2. Unter „prepare bioprint“ wurde über die Funktion „move z“ der Wert für $z=0$ eingestellt.
3. Der *Pressure* wurde für jede Tinte einzeln so eingestellt, dass ein laminarer Fluss entstand. Der *Pressure* wurde zu Anfang auf 0 kPa gestellt. Die Kartusche wurde in den Druckkopf eingesetzt. Die Klappe des Druckkopfes wurde geöffnet und der *Pressure* langsam erhöht, bis ein langsamer laminarer Fluss entstand. Die Klappe wurde wieder verschlossen und der *Pressure* noch um 1-2 kPa erhöht. Die Spitze wurde nach Einstellen des optimalen *Pressures* getauscht, sodass die Tinte nicht innerhalb der Spitze aushärtete.

Nach Durchführung dieser drei Schritte wurde entweder vom Menü des Druckers mit Dateien von einer SD-Karte gedruckt oder direkt vom PC mittels der Software „Repetier Host 2.1.6“. Für jede Tinte wurde der *Pressure* vor dem Druck neu bestimmt. Auch während des Drucks wurde der *Pressure* fortlaufend angepasst, sodass ein ausreichender *Pressure* im gesamten Druckverlauf gegeben war.

4.3.5. Drucken mit einzelnen Tinten

4.3.5.1. Cellink Start

Mit dem Standard Hydrogel des Herstellers wurden die G-Codes getestet und auch komplexere dreidimensionale Strukturen gedruckt.

4.3.5.2. Cellink Bioink

Die Tinte wurde vor der Verwendung auf Raumtemperatur aufgewärmt. Bei Zellkonzentrationen von 10^6 bis 2×10^6 Zellen pro Milliliter Tinte waren bei Raumtemperatur

Material und Methoden

etwa 15 kPa Druck notwendig, um einen konstanten Fluss zu gewährleisten. Nach dem Druck wurde die *Bioink* mit der *Binding Solution* ausgehärtet, indem die Konstrukte knapp mit der *Binding Solution* für 5 min bedeckt waren. Die *Binding Solution* konnte abgezogen werden, sobald die Konstrukte sich vom Boden lösten. Die Konstrukte wurden anschließend in Zellkulturmedium kultiviert.

4.3.5.3. *Gel Ma A*

Gel Ma A ist bei Raumtemperatur fest. Die Druckköpfe wurden auf 26 °C vorgeheizt [77]. Die Tinte wurde vor Verwendung auf mindestens Raumtemperatur erwärmt, sodass sie sich mit den Zellen mischen ließ. Nach dem Mischen mit den Zellen wurde die Kartusche in den auf 26 °C vorgeheizten Druckkopf eingesetzt und für etwa 10-15 min dort belassen, sodass die Tinte auf 26 °C aufheizen konnte. Nach dem Druck wurde *Gel Ma A* genau wie *Cellink Bioink* mit der *Binding Solution* ausgehärtet.

Gel Ma-Produkte lassen sich auch mit UV-Licht aushärten. Abhängig vom verwendeten Verfahren zur Aushärtung wurden unterschiedliche Kartuschen gewählt. Eine Aushärtung mittels UV-Licht benötigte für den Druck UV-Licht-absorbierende Kartuschen, um ein vorzeitiges Aushärten innerhalb der Druckkartusche zu vermeiden. Die Zeiten für das Aushärten der Konstrukte mittels UV-Licht war abhängig von der Entfernung der Konstrukte von der UV-Lampe. Für die verwendeten Testkonstrukte wurden die Druckköpfe in Y-Richtung nach vorne gefahren, sodass ein Abstand von etwa 3-4 cm von der UV-Lampe zu den Konstrukten vorlag. Die Konstrukte wurden dann 1-2 Min mit der 405 nm UV-Lampe bestrahlt.

Alternativ zur *Binding Solution* wurde im Verlauf der Arbeit auf eine selbst angesetzte Aushärtelösung umgestiegen, bestehend aus 0,9 % NaCl-Lösung + 50 mM CaCl₂. Hierfür wurden die benötigten Mengen CaCl₂ und NaCl in VE-Wasser angesetzt und steril filtriert.

4.3.5.4. Bovines Kollagen-Gel

Vor dem Druck musste das Kollagen-Gel bei etwa 4 °C angesetzt werden, bestehend aus:

- 75 µl M199 10x
- 35,75 µl NaHCO₃ 75 %
- 26,5 µl NaOH 1 N
- 108 µl H₂O dest

Material und Methoden

- 578 µl Kollagen I 0,5 %
- pH-Wert-Einstellung mittels etwa 14 µl 1 N NaOH, titriert bis zum rosa Farbumschlag des M199

Das Kollagen-Gel wurde anschließend in die Druckkartusche überführt. Es wurde versuchsweise direkt gedruckt oder 5 bzw. 10 min vor dem Druck in der Druckkartusche auf Raumtemperatur temperiert.

4.3.5.5. Azellulärer Testdruck: Bedrucken von Schwämmchen

In fortführenden Experimenten ist angedacht, auf das Brustfettgewebekonstrukt eine Hautschicht aufzubringen. Hierzu müssen Keratinozyten auf einem Hydrogel kultiviert werden, das auf ein Brustfettgewebekonstrukt aufgebracht worden ist. Um darzustellen, wie der komplette Ablauf eines passgenau gedruckten Konstrukts ablaufen könnte, wurde kleine Kollagenquadrate mit genau einer Lage des oben erwähnten *Cellink Start* bedruckt. Hierfür wurden kleine, 1x1x1 cm große SMI-Spon Geltineschwämmchen gedrittelt und mit einem Tropfen rotem M199 Medium gefärbt. Die kleinen Quadrate wurden dann mit den Seitenkanten parallel zum Rand der Druckplatte auf den Deckel einer Well-Platte im Druckbett gelegt.

Es wurde mit „tinkercad.com“ die Kodierung für kleine Quader mit einer Grundfläche von 1x1 cm und einer Höhe von 2 mm erstellt. Diese Kodierungen wurden als STL-File exportiert und in der „Repetier-Host“ Software geöffnet. Das STL File wurde in eine G-Code-Datei umgeschrieben. Die Datei wurde so eingerichtet, dass der Drucker lediglich zweilagig druckt.

Anschließend wurde *Cellink Start* in die Kartusche überführt und die Kartusche mit einer Druckspitze bestückt. Die Kartusche wurde in den Drucker eingesetzt und die Funktion „Home Axis“ ausgewählt. Mittels der Befehle im „Manuelle Kontrolle“ Panel wurde die Druckspitze auf die Mitte eines Schwämmchens gefahren, sodass sie mittig darüber stehen bleibt. Die Funktion „Calibrate Z“ wurde im Drucker ausgewählt oder mittels „manuelle Kontrolle“ → „G92 Z0“ der Z-Wert auf null gesetzt und anschließend der Befehl G92 X0 Y0 im Befehlsfeld des „Manuelle Kontrolle“ Panels gegeben. Der Druck wurde vom Befehlsfeld des Druckers gestartet.

Material und Methoden

4.3.6. Drucken mit Zellen

Für das Drucken von Konstrukten mit lebenden Zellen wurden die Zellen vorher wie oben beschreiben kultiviert. Das Medium in der Zellkulturflasche wurde entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin bei 37 °C und 5 % CO₂ aus der Zellkulturflasche gelöst. Nachdem die Zellen gelöst waren, wurde die zum Trypsin fünffache Menge Zellmedium hinzugegeben. Die Zellkonzentration wurde mit Hilfe des Luna™ *Automated Cell Counter* in der entstandenen Lösung bestimmt. Die Menge an Zelllösung für bestimmte Zellanzahlen wurde bestimmt, diese Mengen abpipettiert und in 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Danach wurden alle Reaktionsgefäße für fünf min bei 300 G und Raumtemperatur zentrifugiert.

Die Überstände wurden abpipettiert. Das Zellpellet wurde für 1 ml Biotinte in 100 µl Zellkulturmedium resuspendiert (Biotinte zu Zellsuspension 1:10). Die entstandene Zellsuspension wurde in eine *Luer-Lock* Spritze überführt und mit einem *Luer-Lock to Luer-Lock* Adapter versehen. In eine weitere *Luer-Lock* Spritze wurde die anzusetzende Menge Tinte überführt. Die beiden *Luer-Lock* Spritzen wurden verbunden und die Zellsuspension und die Biotinte vorsichtig vermischt. Die eine Spritze wurde abgenommen und aus der anderen Spritze mitsamt dem *Luer-Lock* Adapter vorsichtig die komplette Luft herausgedrückt und -geklopft. Zum Abschluss wurde die entstandene Biotinte-Zellmischung in eine Druckkartusche überführt, diese mit einer Druckspitze versehen und in den Drucker eingesetzt.

4.3.7. Zellviabilitätsversuche mittels MTT

In einem MTT-Assay wurde zu Beginn der Arbeit die Zellviabilität innerhalb der gedruckten Konstrukte gemessen. Im MTT-Assay wird ein gelbes Tetrazoliumsalz in Abhängigkeit von der Viabilität der Zellen zu blau-violettem Formazan reduziert.

Für die Zellviabilitätsversuche mittels MTT wurde in einer 96-Well-Platte fünffache Ausdrücke eines kleinen Quadrats in einer Lage gedruckt. Je fünf Konstrukte wurden gedruckt mit einer Zellkonzentration von 10⁶ Zellen/ml, 2x10⁶ Zellen/ml und einer Leerkontrolle.

Hierfür wurden die 2x2 mm großen, quadratischen Konstrukte zu den jeweiligen Messzeitpunkten in einer 96-Well-Platte mit 100 µl Zellmedium plus je 10 µl 0,5 % MTT-Lösung für vier h inkubiert. Anschließend folgte das Herauslösen des umgesetzten Farbstoffes aus den Zellen mithilfe 100 µl eines Solubilisierungspuffers, bestehend aus

Material und Methoden

Ausdrucke von Zellkonstrukten wurden die Konstrukte mit 50 µl *Binding Solution* beimpft. Nach 3-5 min wurde diese entfernt und die Wells mit 200 µl Fibroblasten-Medium aufgefüllt.

Die Versuchszeiträume für das *AlamarBlue*-Assay mussten definiert und etabliert werden. Bei mit Fibroblasten in *Cellink Bioink* bedruckten Platten wurden nach 1-2 Tagen Kultivierung der Konstrukte das Zellmedium entfernt und jedes Well mit 100 µl *AlamarBlue* -Lösung, die 1:10 in Zellmedium verdünnt wurde, beimpft. Die Messung erfolgte im Well-Plattenleser nach 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 14 h, 16 h, 19 h und 24 h. Der fünffache Ansatz wie oben beschrieben wurde in drei unabhängigen Experimenten wiederholt.

Die Zellviabilität der Fibroblasten und der adMSC in Monokultur wurde mittels *AlamarBlue* Assay an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 gemessen. Tag 0 wurde hierbei als Tag des Drucks definiert, *AlamarBlue*-Reagenzien wurden also einige Stunden nach dem Druck hinzugegeben. Die Messung des *AlamarBlue*-Umsatzes erfolgte im Well-Plattenleser nach 19 h Einwirkzeit. Der beschriebene Ansatz wurde in drei unabhängigen Experimenten wiederholt.

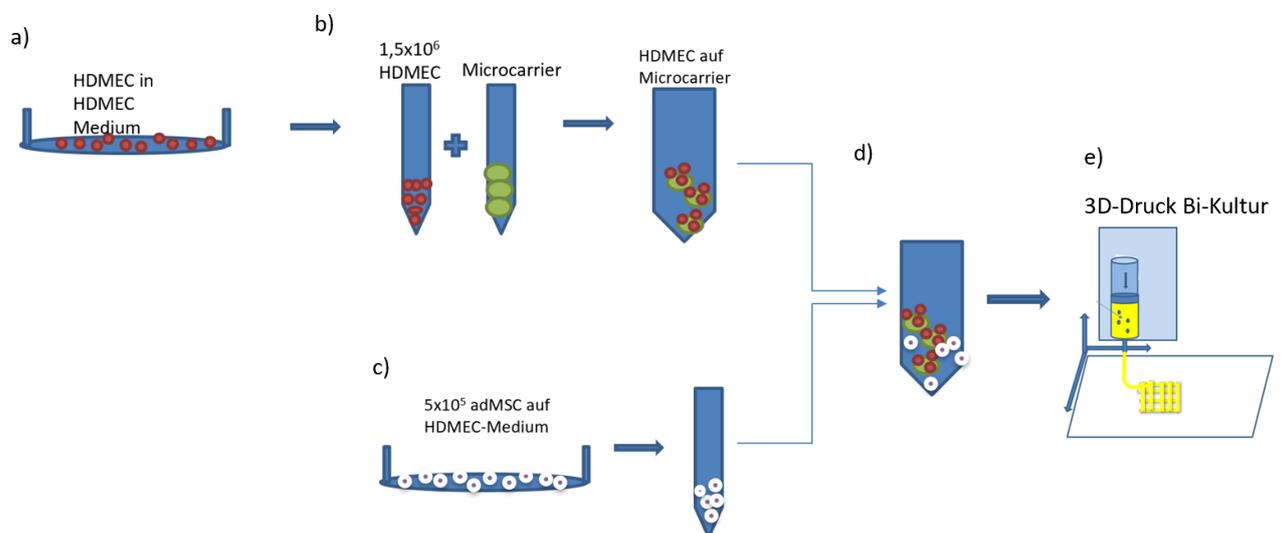
Die Well-Platte wurde zur UV-Karenz während des *AlamarBlue*-Versuchs in Aluminium-Folie eingewickelt. Die Messung im Well-Plattenleser erfolgte mit bedruckter Platte bei 640 nm. Nach der Messung wurde die *AlamarBlue*-Lösung aus den Wells entfernt und die einzelnen Wells mit 200 µl PBS gewaschen. Die Wells wurden mit 200 µl Zellmedium beimpft und je nach Versuchsaufbau weiter kultiviert.

Die Viabilität der Bi-Kultur-Konstrukte wurde zu den Messzeitpunkten an den Tagen 0, 5, 7, 10, 14 und 21 mit einem *AlamarBlue*-Assay gemessen. Hierfür wurden drei Konstrukte ausgewählt, das Medium aus den Wells entfernt und die Konstrukte mit 500 µl 1:10 *AlamarBlue*-Lösung in HDMEC-Medium beimpft. Nach 4 h und 24 h erfolgte die Messung in separaten 96-Well-Platten, in die 100 µl aus jedem Well einzeln hinein pipettiert wurde.

Material und Methoden

4.3.9. Bi-Kultur adMSC + HDMEC

Für das Drucken der Bi-Kultur adMSC + HDMEC wurden die HDMEC auf *Microcarrier* geladen (Grafik 6, b). Anschließend wurden pro ml Biotinte mit $1,5 \times 10^6$ HDMEC und 5×10^5 adMSC gearbeitet. Die adMSC wurden einige Tage vorher schrittweise auf HDMEC-Medium umgestellt (Grafik 6, c). Die HDMEC auf *Microcarrier* wurden am Tag des Drucks mit 5×10^5 adMSC gemischt (Grafik 6, d), abzentrifugiert und in 100 μ l HDMEC-Medium resuspendiert, um mit 1 ml Biotinte vermischt zu werden. Diese wurde in zweilagige Gitter gedruckt (Grafik 6, e) und die Viabilität mittels *AlamarBlue* Assay untersucht.



Grafik 6, Ablauf 3D-Biodruck Bi-Kultur, a) die HDMEC wurden kultiviert b) HDMEC wurden ausgezählt und auf den Microcarrier angesiedelt c) adMSC wurden auf HDMEC-Medium umgestellt und aus der Flasche herausgelöst d) HDMEC auf Microcarrier und adMSC wurden gepoolt und gemeinsam in Biotinte gemischt e) die Bi-Kultur wurde in rasterförmigen Konstrukten gedruckt.

4.3.9.1. Celltracker-Färbung

Vor der weiteren Verwendung der Zellen wurden diese mit *Celltracker* gefärbt. Hierfür wurden die HDMEC mit *Celltracker green* und die adMSC mit *Celltracker red* gefärbt. Das Zellmedium wurde entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die *Celltracker* wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und zu einer 10 μ M Lösung in DMSO verdünnt. Diese Stammlösung wurde bei -20°C aufbewahrt. Die Stammlösung wurde 1:1000 in Zellmedium verdünnt und die Zellen mit diesem für 30 min bei 37°C , 5 % CO_2 inkubiert. Für eine 175 cm^2 -Zellkulturflasche entsprach dies 10 ml Zellmedium mit

Material und Methoden

10 µl Celltracker-Stammlösung. Die Celltracker-Lösung wurde abgenommen, die Zellen erneut mit PBS gespült und mit Zellmedium weiterbehandelt.

4.3.9.2. *Vorbereitung und Beladung der Microcarrier*

Zur Vorbereitung der Endothelzellen wurden diese auf kollagenbasierende *Microcarrier* geladen. Diese ermöglichten den Zellen, schon vor dem 3D-Druck Zell-Zellkontakte auszubilden. Die *Cultisper-S-Microcarrier* (Sigma-Aldrich, Schweden) wurden in einer 1 mg/ml Konzentration in PBS gelöst, für 1 h gequell und anschließend bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Die *Microcarrier* wurden bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt. Pro Versuchsansatz wurden 4 ml der angesetzten *Microcarrier*-Lösung (entsprechend etwa 4000 *Microcarrier*) abgenommen und für 5 min bei 200 G und Raumtemperatur zentrifugiert. Gleichzeitig wurden HDMEC aus den Zellkulturflaschen herausgelöst und ausgezählt. Aus der HDMEC-Suspension wurde die Menge Suspension abgenommen, dass $1,5 \times 10^6$ Zellen in der Lösung enthalten waren. Das Pellet aus *Microcarrier* wurde mit dieser Zellsuspension resuspendiert und die entstandene Suspension für 5 min bei 200 G und RT zentrifugiert (Grafik 6, b). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml HDMEC-Medium resuspendiert. Die entstandene Suspension wurde auf zwei 15 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und für vier h bei 37 °C und 5 % CO₂ mit geöffnetem, aufliegendem Deckel des Reaktionsgefäßes inkubiert. Alle 30 min erfolgte die vorsichtige Resuspension mittels einer 2-3 mm vor dem Ende abgeschnittenen, 1000 µl Pipettenspitze. Nach den 4 h wurde die HDMEC-*Microcarrier*-Suspension in eine unpolare, 96-Well-Platte mit 5x200 µl/Well gegeben und nach 1-3 Tagen verwendet.

4.3.9.3. *3D-Biodruck Bi-Kultur*

Die HDMEC-*Microcarrier*-Suspensionen wurde aus der unpolaren 96-Well-Platte in einem 15 ml Reaktionsgefäß gepoolt. Die auf HDMEC-Medium umgestellten adMSC wurden aus der Zellkulturflasche herausgelöst und ausgezählt. 5×10^5 adMSC wurden zu den *Microcarrier* mit HDMEC pipettiert und die entstandene Bi-Kultur für 5 min bei Raumtemperatur und 250 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl HDMEC-Medium aufgenommen.

Die HDMEC-*Microcarrier*-adMSC-Zellsuspension wurde in eine 3 ml *Luer-Lock* Spritze überführt. Die Mischung der Suspension erfolgte mit 1 ml Biotinte wie in Kap. 4.3.6 beschrieben. Anschließend erfolgte die Überführung in eine Druckkartusche und das

Material und Methoden

Einsetzten in den Druckkopf. Gedruckt wurde mit einer *sterile standard conical bioprinting nozzle* in blau (410 µm, 22G). Es wurden in einer 24-Well-Platte mindestens 21 zweilagige, 6x6 mm große Gitter gedruckt. Zur Leerkontrolle wurden mindestens drei zweilagige, 6x6 mm große Gitter ohne Zellen gedruckt. Alle Konstrukte wurden nach dem Druck für etwa 2-5 min mit 200 µl *Binding Solution* beimpft, bis die Konstrukte sich vom Boden der Wells lösten. Die *Binding Solution* wurde abgenommen und die Konstrukte in 500 µl HDMEC-Medium kultiviert.

4.3.9.4. *Fixieren der Bi-Kultur-Konstrukte*

Zu jedem Messzeitpunkt wurden zwei Konstrukte jedes Ansatzes fixiert. Hierfür wurden die Konstrukte mit einer Pinzette in eine andere 24-Well-Platte überführt und für 1 h mit Histofix 4,5 % + 50 mM CaCl₂ bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das Histofix 4,5 % entfernt und die Konstrukte bis zum Schneiden und Färben in PBS + 50 mM CaCl₂ gelagert. Da in der 50 mM CaCl₂-Lösung in PBS ein Feststoff ausfiel, wurde im Verlauf der Arbeit auf eine 0,9 % NaCl Lösung + 50 mM CaCl₂ umgestiegen.

4.3.9.5. *Immunhistochemie der fixierten Bi-Kultur-Konstrukte*

Der Nachweis der Endothelzellen erfolgte über eine CD31-Färbung und der Nachweis der adMSC über eine CD34-Färbung. Die jeweiligen Antikörper wurden mittels eines Sekundärantikörpers, der einen Farbstoff umsetzte, sichtbar gemacht. So konnte eine Analyse der Zellen innerhalb der gedruckten Konstrukte erfolgen.

Die fixierten Konstrukte aus den Bi-Kultur Versuchen wurden für die Färbung entwässert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden die Konstrukte geschnitten und auf Objektträgern verteilt. Das Paraffin wurde für min. 30 min bei 60 °C aus den Schnitten herausgeschmolzen und mit Zellstoff abgetrennt. Die Objektträger wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Hierfür wurden die Objektträger dreimal zehn min in Xylol, zweimal 2 min in *iso*-Propanol, zweimal 2 min in 96 % Ethanol, zwei min in 70 % Ethanol und eine Minute in destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger in eine Küvette mit *Dako high Puffer (pH 9)* befüllt und für 10 min im Dampfgarer demaskiert. Die Objektträger wurden danach für 10 min bei RT getrocknet. Die endogenen Peroxidasen wurden mit 3 % H₂O₂ für 10 min bei Raumtemperatur geblockt. Die Objektträger wurden anschließend abgeklopft und mit

Material und Methoden

destilliertem Wasser und PBS gespült. Die Präparate wurden für 1 h mit PBS + 1 % BSA inkubiert und danach abgeklopft.

Die Inkubation mit dem primären Antikörper gegen CD31 und CD34 erfolgte mit 100 µl der 1:50 verdünnter Antikörperlösung über Nacht bei 4 °C. Die Objektträger wurden nach der Inkubation mit dem Primärantikörper dreimal 2 min in PBS gewaschen. Die Präparate wurde mit je 100 µl Dako *Real Envision* Sekundärantikörper beimpft und für 30 min in geschlossener Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Objektträger wurden erneut dreimal 2 min in PBS gewaschen. Die Präparate wurden für 2-4 min mit 1:50 DAB⁺-Chromogen in DAB⁺-Puffer inkubiert, abgeklopft und dreimal 2 min in destilliertem Wasser gewaschen.

Anschließend wurden die Objektträger für 20 min mit Hämalaun gefärbt und für 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Zum Abschluss wurden die Objektträger mit VE-Wasser ab gespült und mit einer aufsteigenden alkoholischen Reihe entwässert, bestehend aus kurzem Spülen in 70 % Ethanol, drei min 96 % Ethanol, zwei Mal jeweils fünf min *iso*-Propanolol, drei Mal jeweils 5 min Xylol und direktem Eindeckeln mittels Roti® Histokitt II. Die Objektträger wurden über Nacht trocknen gelassen und die Fotos mit dem Labormikroskop DM IL LED aufgenommen.

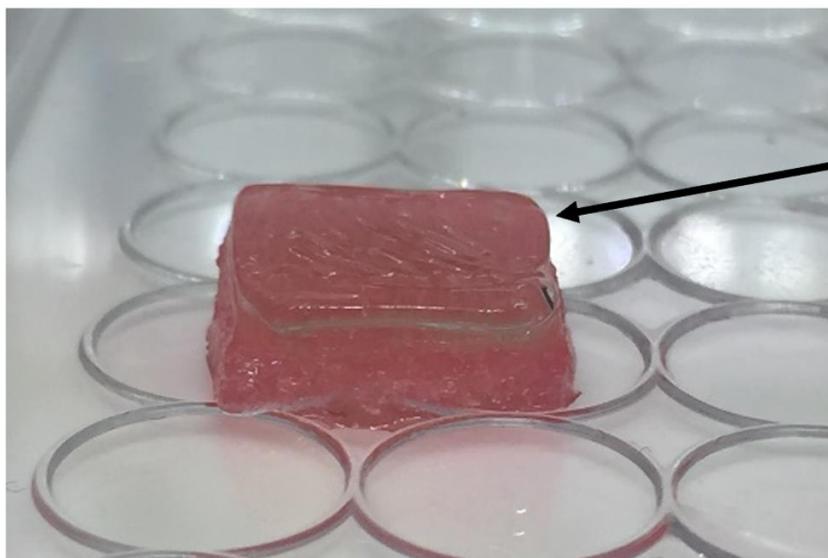
5. Ergebnisse

Für diese Arbeit galt es, den 3D-Druck zur Rekonstruktion der weiblichen Brust zu etablieren. Im Ergebnisteil ist das Ergebnis eines Testdrucks, die Isolierung der adMSC und die Differenzierung zu Fettzellen und zum Abschluss die Viabilität der gedruckten Konstrukte mit Fibroblasten und adMSC in Monokultur sowie HDMEC und adMSC in Bi-Kultur aufgeführt.

5.1. Einstellung der Druckparameter

5.1.1. Azellulärer Testdruck: Bedrucken von Schwämmchen

Als Anwendungsbeispiel wurden mit dem *Cellink Start*, welches als Testtinte verwendet wird, kleine, aus Gelatine bestehende Schwämmchen bedruckt. In einem ähnlichen Versuchsaufbau könnten in weiteren Experimenten Fettgewebstrukturen mit einer weiteren Hydrogelschicht bedruckt und mit Keratinozyten besiedelt werden. Außerdem war dieses Beispiel zum Verständnis des Codeaufbaus und des 3D-Druckers relevant. Da der Drucker als Startposition die Mitte des Schwämmchens festgelegt hatte, wurde der 1x1 cm große Gelquader passgenau auf das Schwämmchen gedruckt (Grafik 7).



Hydrogel auf dem rot angefarbten, quadratischen Schwämmchen

Grafik 7, Ein mit Hydrogel genau bedrucktes, gefärbtes Schwämmchen; das klare Hydrogel hebt sich spiegelnd von dem mit rotem Medium gefärbten Kollagenschwämmchen ab.

Ergebnisse

5.1.2. Drucken mit zwei Druckköpfen

Das Drucken mit zwei Druckköpfen simultan erfolgte nach im Methodenteil beschriebenen Schema problemlos. Der Drucker druckt entsprechend dem G-Code vor dem Wechsel der Druckköpfe mit Druckkopf 1, nach dem Wechsel mit Druckkopf 2. Die Kartuschen lassen sich in die Druckköpfe mit einer Höhenvarianz von etwa 0,5 cm einsetzen. Hierauf muss geachtet werden, da sich nur ein z=0 Wert einstellen lässt.

5.1.3. Drucken mit bovinem Kollagen-Gel

Das Kollagen-Gel war für den direkten Druck zu flüssig und lief aus der Druckkartusche heraus. Wurde fünf oder zehn Min gewartet und die Druckkopfverschlussklappe geöffnet, polymerisierte das Kollagen in der Spitze aus.

5.1.4. UV-Aushärten von Gel Ma-Produkten

Es wurden Konstrukte mit Tinte aus der *Gel Ma*-Reihe gedruckt und mit UV-Licht ausgehärtet. Die so ausgehärteten Konstrukte wiesen augenscheinlich eine ähnliche Stabilität auf wie die mittels Binding Solution ausgehärteten Konstrukte.

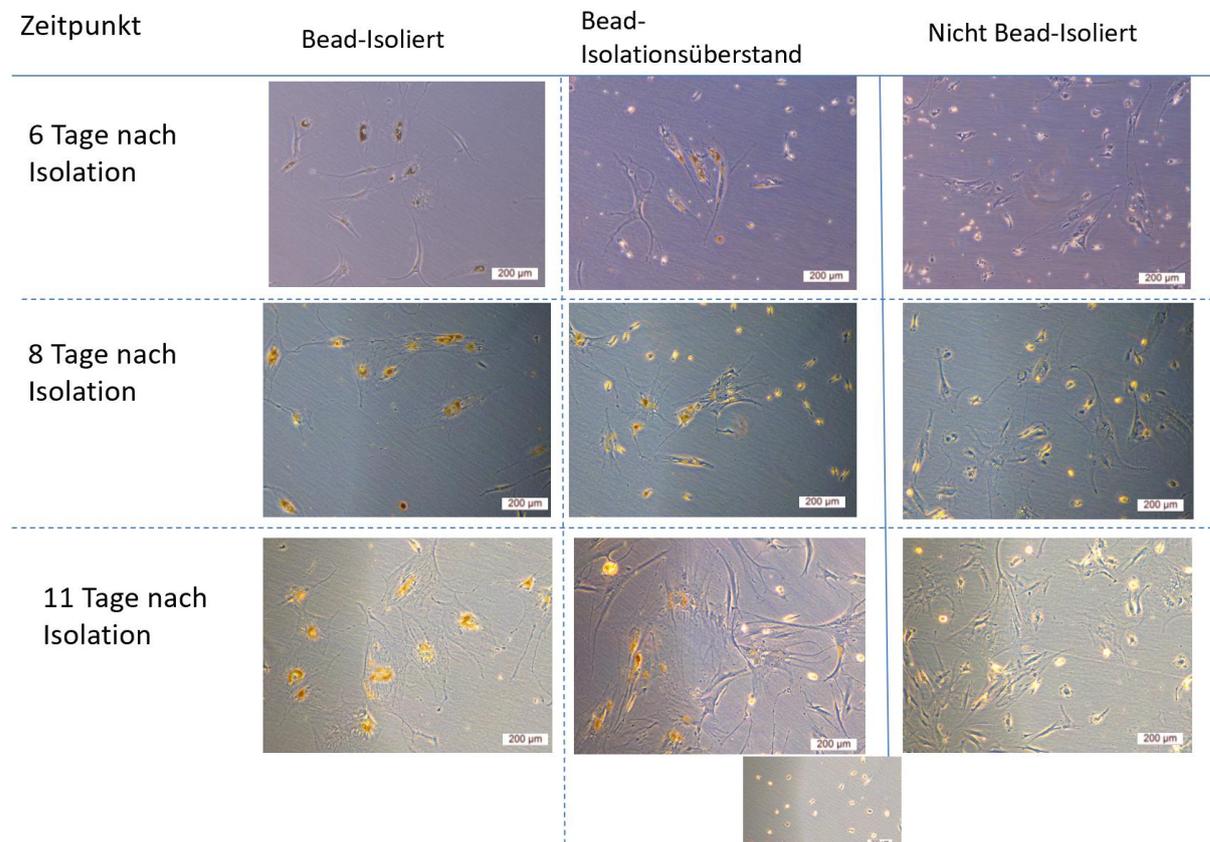
5.2. adMSC-Isolierung

Um die Isolierung und Kultivierung der adMSC im Labor zu etablieren, wurde das Protokoll den Anforderungen angepasst. Wichtig war hierbei die eindeutige Identifikation der adMSC und die Abgrenzung von einer Mischkultur mit Fibroblasten. Die Selektion der adMSC erfolgte versuchsweise mittels magnetischer Dynabeads® über das Oberflächenmolekül CD34. Nach der Bead-Isolation wurden sowohl die Bead-isolierten Zellen als auch der Überstand der ersten Bead-Isolation kultiviert. Weiterhin wurde vom selben Spender ein Teil der Zellsuspension ohne Bead-Isolation in eine eigene Zellkulturflasche überführt und kultiviert. Es erfolgten die Kultivierung und mikroskopische Untersuchung der Zellkulturen sowie eine Cytospin-Fixierung jedes Ansatzes.

Zellmorphologisch ließen sich im Verlauf nur geringe Unterschiede zwischen den Bead-isolierten Kulturen, dem Überstand der ersten Bead-Isolation oder den nicht-Bead-isolierten Zellkulturen feststellen (Grafik 8). Während sowohl in der Bead-isolierten Kultur als auch in deren Überstand viele flächige, eher unregelmäßige Zellen mit gebundenen Dynabeads® zu sehen waren, stellte sich dieses Zellbild, ohne gebun-

Ergebnisse

dene Dynabeads®, auch in der nicht-Bead-isolierten Kultur dar. In der nicht-Bead-isolierten Kultur stellten sich zum Teil vermehrt Zellen mit langstreckigen Ausläufern dar, die in der Bead-isolierten Kultur nicht oder nur weniger zu sehen waren.



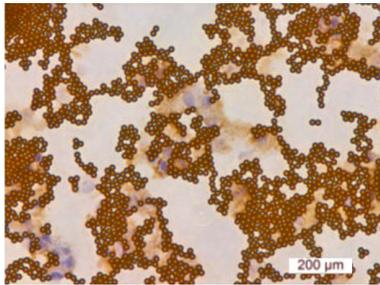
Grafik 8, Vergleich Bead-Isolation vs. nicht-Bead-isoliert. Alle Ansätze zeigen unregelmäßige, flächige Zellen. In den Kulturen sind die Beads deutlich zu erkennen, sowohl in der Bead-isolierten Probe als auch im Bead-Isolationsüberstand sind die Beads an die Zellen gebunden. Die Bead-Isolierten und nicht Bead-isolierten Zellen haben zu Tag 11 eine 25 cm² vollgewachsen und wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen überführt.

In der CD34-immuncytochemischen Färbung der fixierten Cytospin-Präparate der Fettgewebszellen zeigten sich CD34-positive Zellen in der Bead-isolierten und in der nicht-bead-isolierten Gruppe (Grafik 9). Auch in dem Bead-Isolationsüberstand zeigten sich in geringem Ausmaß CD34-positive Zellen.

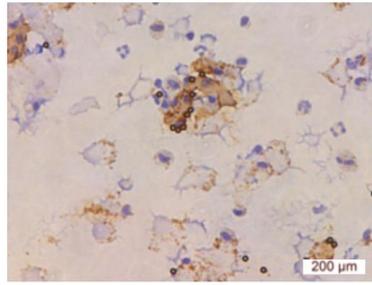
Ergebnisse

CD34-Immuncytochemie am Tag der Isolation

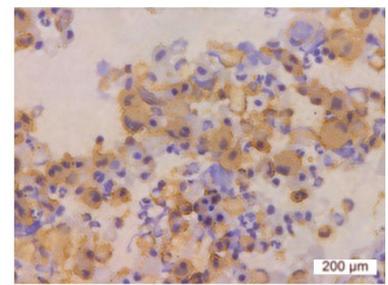
Bead-Isolation



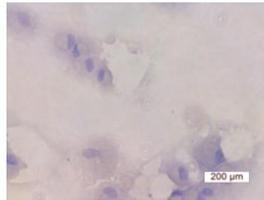
Bead-Isolationsüberstand



nicht Bead-Isoliert



Fibroblasten als neg. kontrolle



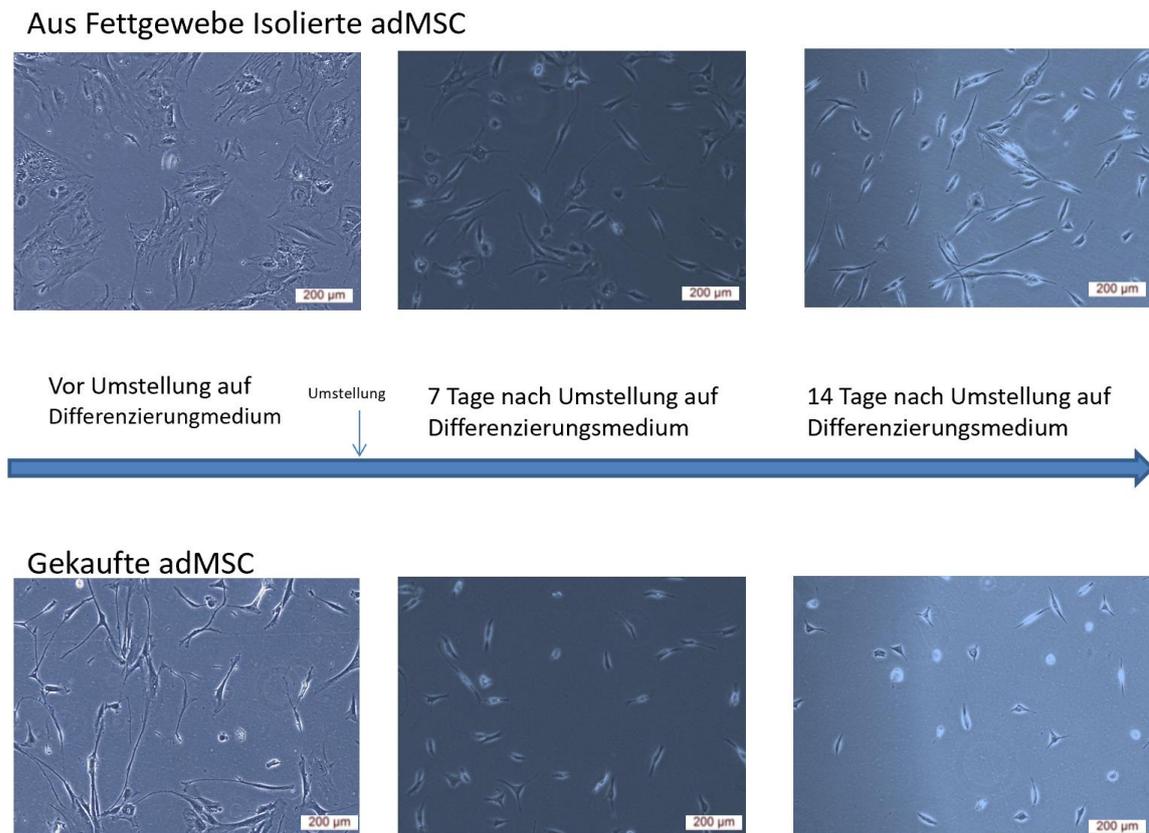
Grafik 9, Immuncytochemische Färbung von CD34 am Tag der Isolation; Zellen wurden auf Objektträger aufzentrifugiert und fixiert. Die Immuncytochemie erfolgte mit CD34-Antikörpern.

5.3. adMSC-Differenzierung

Zur Überprüfung der Differenzierbarkeit der adMSC wurden diese mit PBS gespült und für 14 Tage auf Differenzierungsmedium umgestellt. Um zu überprüfen, ob die selbst isolierten adMSC mit den gekauften der Firma *PeloBiotech* vergleichbar sind, wurden beide Zellkulturen synchron umgestellt.

Ergebnisse

Die Umstellung auf das Differenzierungsmedium wurde von den selbst isolierten adMSC besser vertragen. Während hier einige Zellen starben und sich die überlebenden Zellen differenzierten, starb in der Kultur der PeloBiotech-Zellen etwa die Hälfte der Zellen ab (Grafik 10). Zellmorphologisch zeigten die Zellen bei der Differenzierung einen Übergang von flächigen, unregelmäßigen Zellkörpern hin zu kleineren Zellkörpern mit längeren Ausläufern und kleinen Vesikeln (Grafik 11, rechts im Bild). Sobald diese Vesikel sichtbar wurden, wurden die Zellkulturen auf Adipozyten-Erhaltungsmedium umgestellt (Grafik 11, rechts im Bild).



Grafik 10, Morphologie der Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung. Gezeigt sind Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellkultur am Tag vor Umstellung auf das Differenzierungsmedium und an den Tagen 7 und 14 nach Umstellung auf das Differenzierungsmedium.

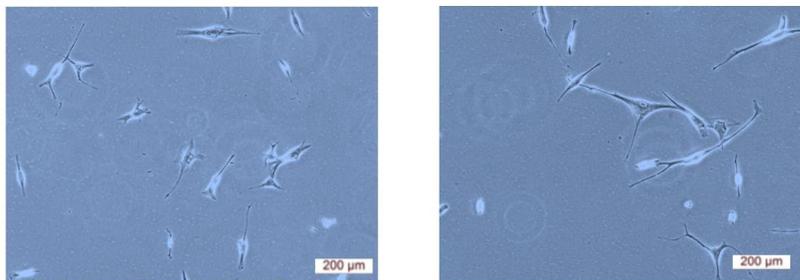
Die Umstellung von Differenzierungs- auf Erhaltungsmedium erfolgte ohne sichtbares, weiteres Versterben der Zellen. Die Zellen bildeten zellmorphologisch weitere Vesikel-ähnliche Gebilde aus (Grafik 11). Auf dem Kulturmedium bildete sich ein Fettfilm.

Ergebnisse

Aus Fettgewebe Isolierte adMSC



Gekaufte adMSC

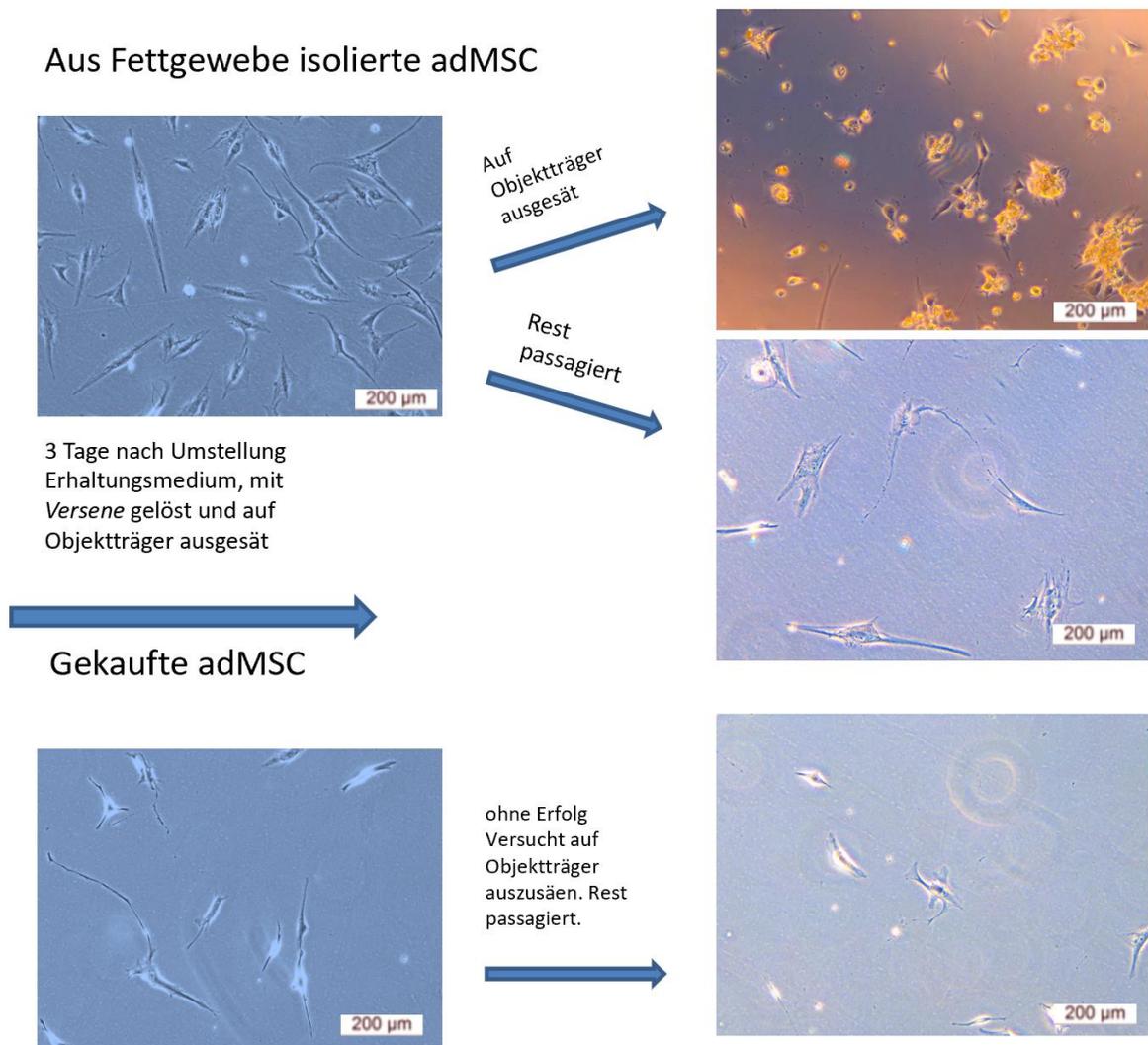


Grafik 11, adMSC bei Umstellung von Differenzierungs- auf Erhaltungsmedium, ganz rechts im Bild: Ausschnittsvergrößerung Fettvakuolen, mit Pfeil markiert.

Nach 14 Tagen Differenzierungs- und 3 Tagen Erhaltungsmedium wurden die Zellen versuchsweise mit Trypsin oder *Versene* aus der Zellkulturflasche gelöst. Hierbei lösten sich die Zellen weder mit Trypsin noch mit *Versene* aus den Zellkulturflaschen. Die trotzdem gelöste Zellsuspension wurde abzentrifugiert und auf 8-Kammer-Objektträger ausgesät. Die Zellen wurden über 2-4 Tage anwachsen gelassen und anschließend fixiert. Die Flaschen mit den passagierten Zellen zeigten eine deutlich verminderte Zellzahl, auf den Objektträger mit den aus Fettgewebe isolierten adMSC zeigten

Ergebnisse

sich neben angewachsenen Zellen mit flächigen Ausläufern viele abgekugelte Zellkörper (Grafik 12).

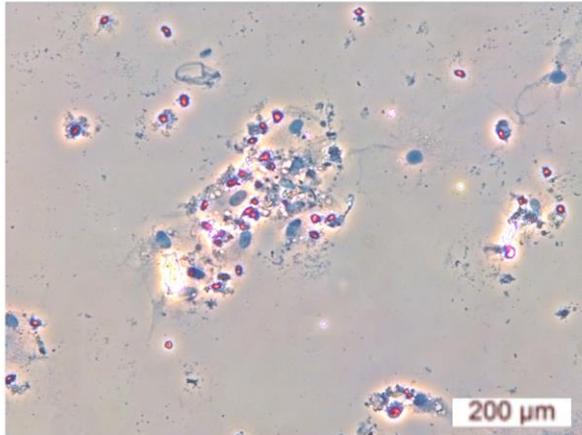


Grafik 12, Herauslösen der differenzierten adMSC aus den Zellkulturflaschen.

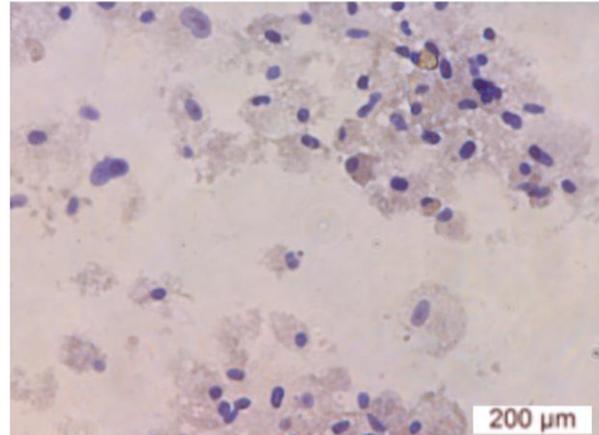
Die ausgesäten Zellen wurden sowohl mittels *Oil Red O* als auch immunocytochemisch mit einer CD34-Antikörperfärbung gefärbt. Während sich eine Aufnahme des *Oil Red O*-Farbstoffes in die differenzierten Zellen zeigte, war die immunhistochemische CD34-Färbung negativ (Grafik 13).

Differenzierte adMSC: Oil Red +, CD34 -

Oil red O



CD34-Immuncytochemie



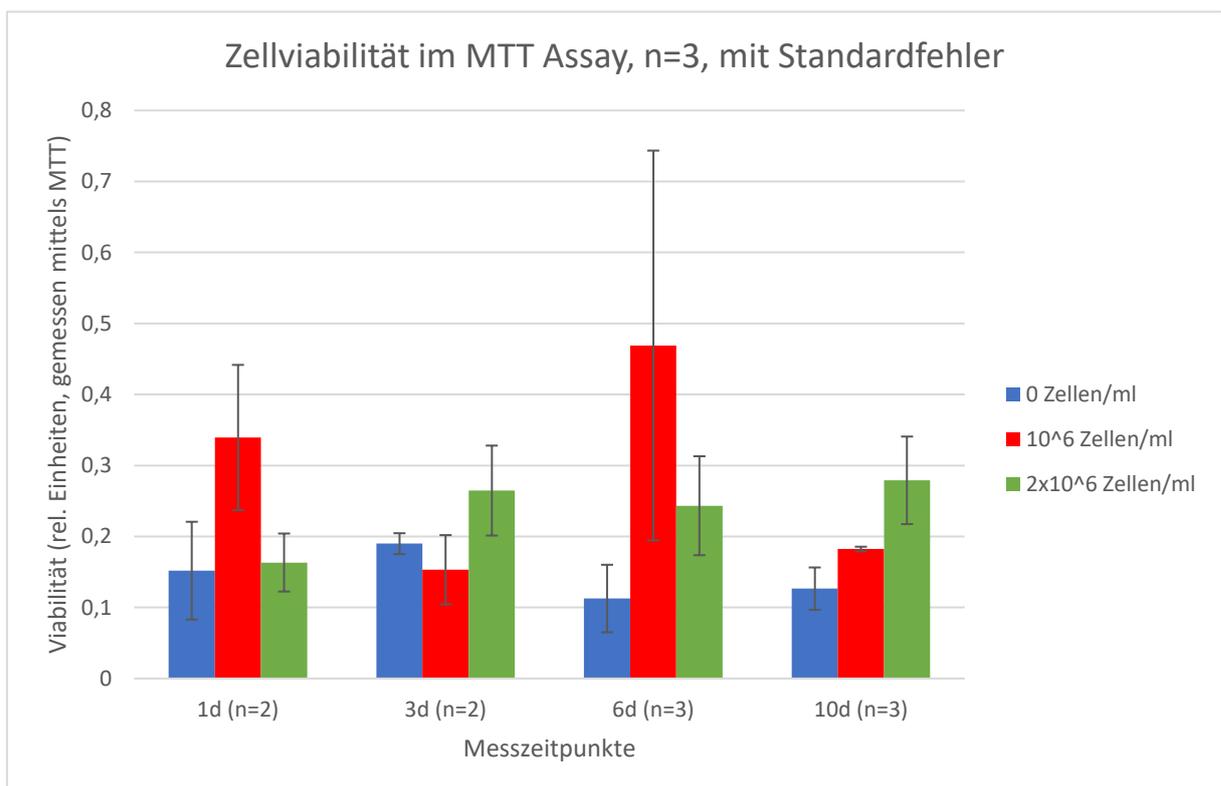
Grafik 13, Differenzierte adMSC, Oil Red O und CD34-Immuncytochemisch gefärbt.

Ergebnisse

5.4. Zellviabilität im gedruckten Konstrukt

5.4.1. Zellviabilitätsmessungen mittels MTT

Die Zellviabilität wurde nach 1, 3, 6 und 10 Tagen mittels eines MTT-Assays gemessen. Die Viabilitätswerte der Leerkontrollen schwankten zwischen 0,11 und 0,19 der relativen Einheiten. Die Konstrukte mit 10^6 Zellen/ml Tinte zeigten für den ersten Tag etwas mehr als das Doppelte der Leerkontrolle an, fielen zu Tag 3 ab und stiegen Tag 6 sehr stark an. Für Tag 10 lagen die Viabilitätswerte der Konstrukte mit 10^6 Zellen/ml oberhalb der Leerkontrolle und unterhalb der Werte der Konstrukte mit 2×10^6 Zellen/ml Biotinte. Die Konstrukte mit 2×10^6 Zellen/ml Biotinte zeigten an Tag 1 ähnliche Werte wie die Leerkontrolle, steigen dann auf etwa 0,25 relative Einheiten an und blieben über die weiteren Messungen dort konstant (Grafik 14).



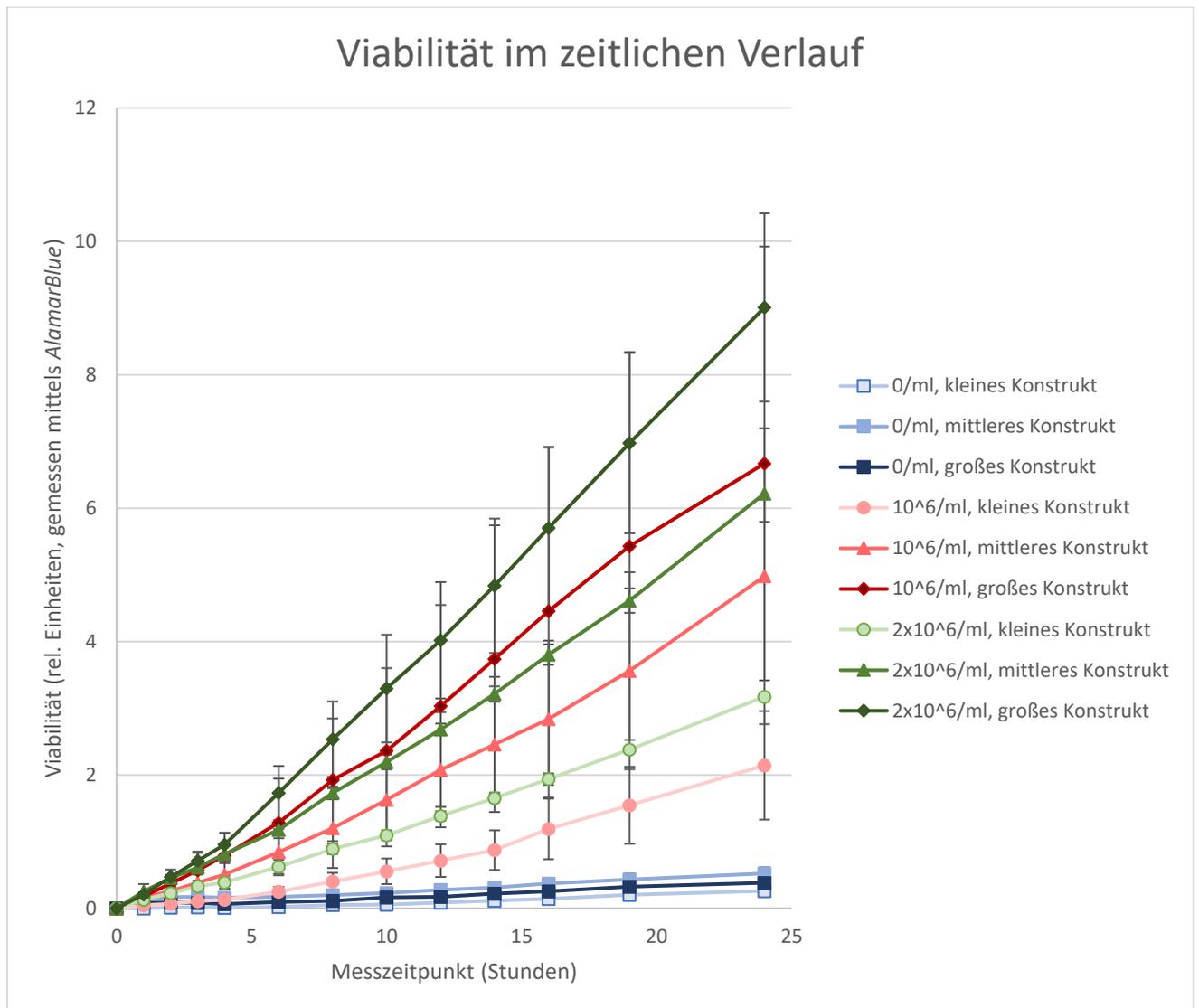
Grafik 14, Zellviabilität von Fibroblasten in Cellink Bioink, Werte gemessen in Absorptionsdifferenzen zwischen 525 nm und 580 nm Wellenlänge mittels MTT-Assay. Für jeden Messzeitpunkt wurde eine eigene Platte mit je fünf Konstrukten unterschiedlicher Zellkonzentration bedruckt. Am Tag nach dem Druck (1 d) wurde der MTT-Assay angesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen sowie der daraus resultierende Standardfehler.

Ergebnisse

5.4.2. Zellviabilität, bestimmt über *AlamarBlue*

Um die Verwendung des *AlamarBlue*-Assays als Methode zur Bestimmung der Viabilität zu beurteilen, wurde die Viabilität in 3D-gedruckten Konstrukten verschiedener Zellkonzentrationen und verschiedener Größe mit unterschiedlichen Einwirkzeiten von *AlamarBlue* bestimmt. Hierfür wurden unterschiedliche Konstruktgrößen (ein 1x1 mm großes Quadrat in 2, 4 und 6 Lagen) mit unterschiedlicher Zellkonzentration von Fibroblasten gedruckt und über einen Zeitraum von 24 h untersucht. Zu Beginn der Messung (1 h) unterscheidet sich die Fluoreszenz der großen, zellreichen Konstrukte kaum von der Fluoreszenz der zellfreien Konstrukte. Im Verlauf nimmt der Abstand der einzelnen Werte zueinander, aber vor allem zu den zellfreien Konstrukten zu. Ein Plateau wird auch von den größten, zellreichsten Konstrukten im Verlauf der 24 h nicht erreicht. Die zellfreien Konstrukte zeigen nur einen minimalen Anstieg im Verlauf der 24 h (Grafik 15).

Da die zellfreien Konstrukte über 24 h nur eine im *AlamarBlue* Assay geringfügig farbliche Reaktion aufwiesen, wurden für die weiteren Abbildungen die Werte der zellfreien Konstrukte von den Werten der entsprechenden zellbesiedelten Konstrukte subtrahiert. Die Leerkontrollen blieben in allen weiteren Versuchen auch über längere Versuchsdauern (14 Tage, 21 Tage) konstant.



Grafik 15, Viabilität im zeitlichen Verlauf ($n=3$), bestimmt über den Farbumschlag im AlamarBlue-Assay. Es sind relative Werte zum kleinen zellosten Konstrukt bei 1 h im Verlauf von 24 h gezeigt. Hierfür wurden 96-Well-Platten mit je fünf Konstrukten einer bestimmten Zellkonzentration in bestimmter Form gedruckt. Während die zellosten Konstrukte ihre Fluoreszenz im Verlauf der 24 h kaum ändern, ist vor allem bei den großen Konstrukten eine deutliche Zunahme zu erkennen. Nach 19 bzw. 24 h sind auch die kleinen Konstrukte mit wenigen Zellen deutlich von den Leerkontrollen zu unterscheiden. Der Standardfehler ist eingezeichnet.

5.4.3. Fibroblasten-Viabilität im gedruckten Konstrukt

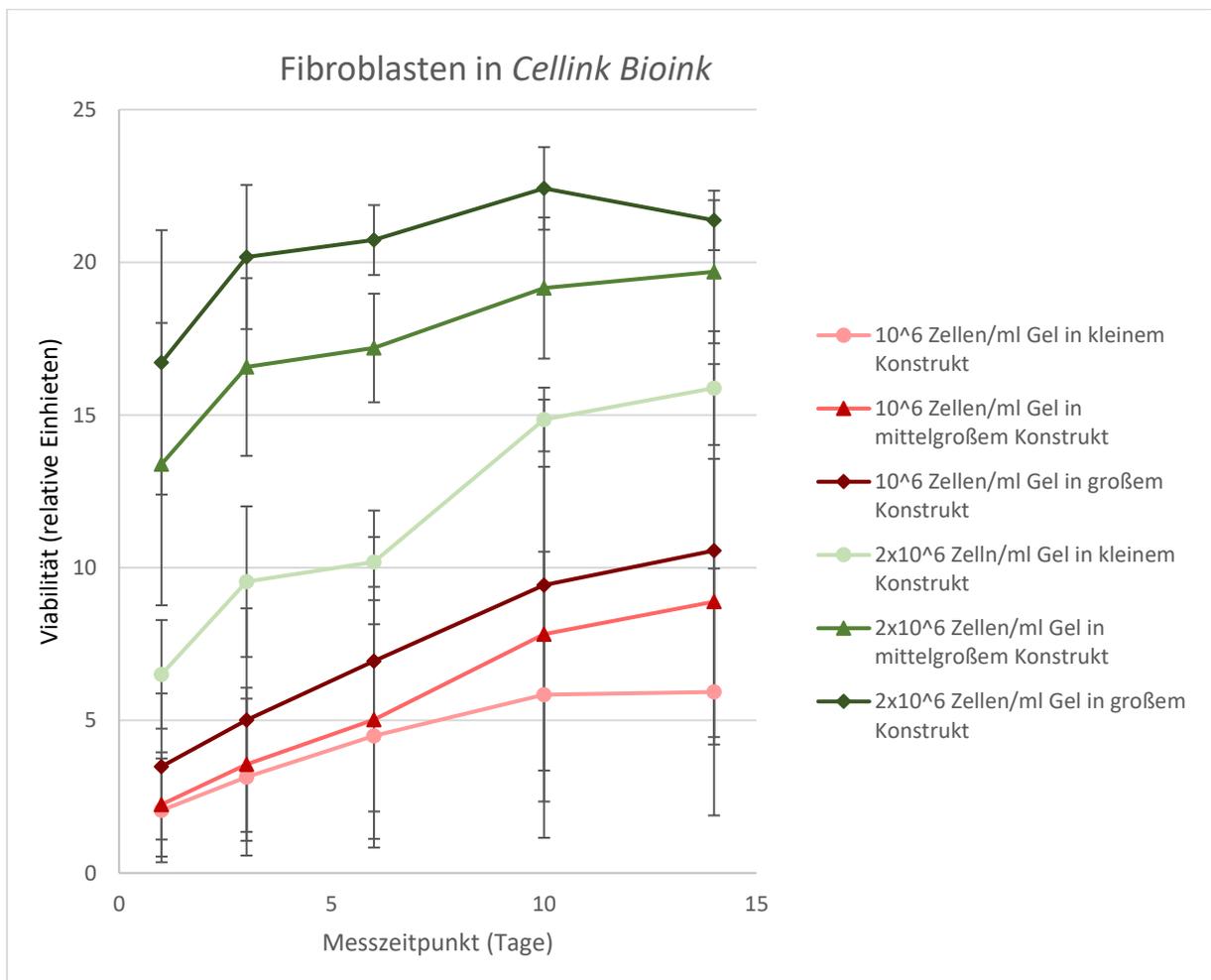
5.4.3.1. Zellviabilität von Fibroblasten in Cellink Bioink

Die Viabilität der Monokultur von Fibroblasten im gedruckten Konstrukt in *Cellink Bioink* wurde über 14 Tage untersucht. Die Darstellung erfolgt abzüglich der Viabilitäts-werte der Leerkontrollen. Es wurden Fibroblasten in unterschiedlichen Zellkonzentra-

Ergebnisse

tionen in unterschiedlich große Konstrukte gedruckt. Hierdurch konnte eine Plausibilität abgeleitet werden, indem die Konstrukte mit vielen Zellen (also große oder Zellreiche Konstrukte) eine größere Viabilität im AlamarBlue-Assay zeigten als die Konstrukte ohne Zellen oder den kleinen, zellärmeren Konstrukten.

Die Viabilitätswerte lagen für alle Konstrukte für den Beobachtungszeitraum zwischen 2,5 und 22,5 relativen Einheiten. Es waren in allen Konstrukten vitale Zellen vorhanden. Mit steigender Zellkonzentration und steigender Konstrukt-Größe werden höhere Werte im *AlamarBlue* Assay erreicht. Der Anstieg der Zellviabilität im zeitlichen Verlauf ist bei den einzelnen Zell-Konstrukten ähnlich. Zwischen Tag 10 und Tag 14 scheinen die Werte für die größten Konstrukte mit der höchsten Zellzahl, genau wie die kleinen Konstrukte mit 10^6 Zellen/ ml Biotinte ein Plateau zu bilden (Grafik 16).

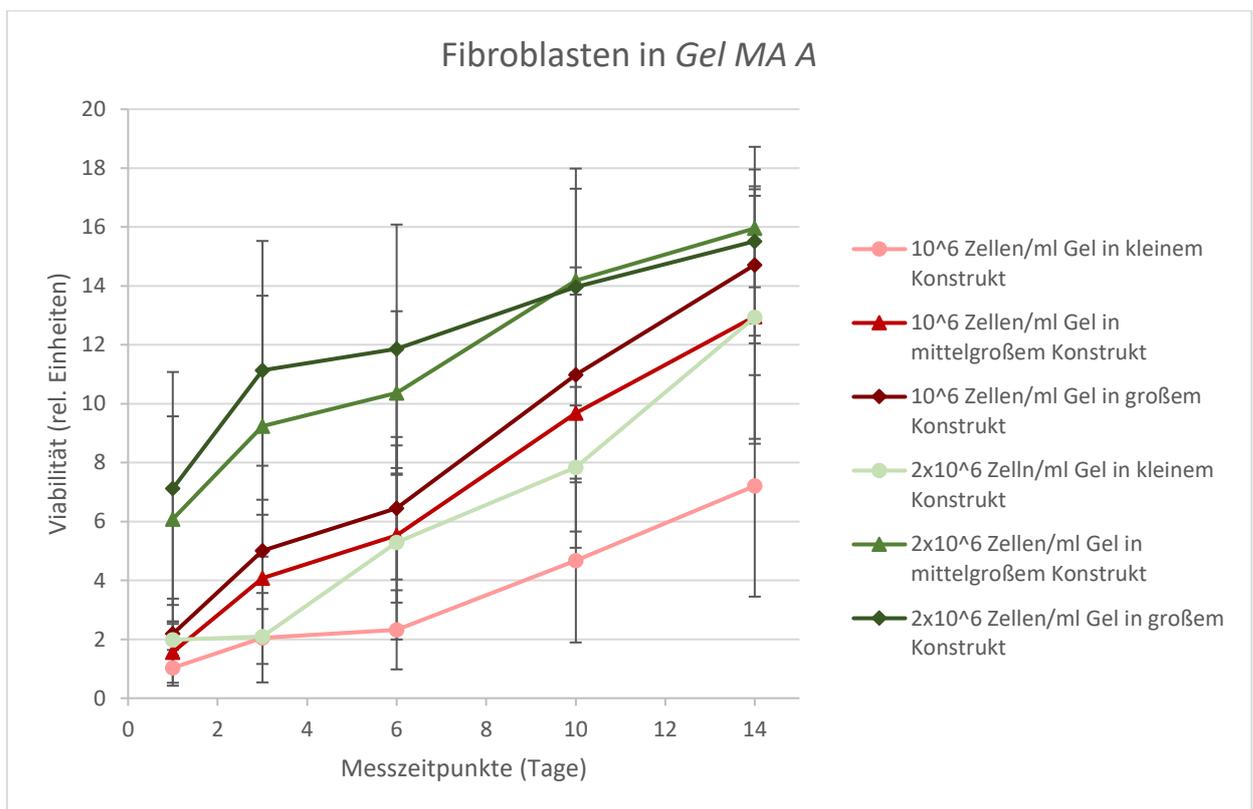


Grafik 16, Zellviabilität von Fibroblasten in Cellink Bioink ($n=4$). Hierfür wurden 96-Well-Platten mit je fünf Konstrukten einer bestimmten Zellkonzentration in verschiedener Größe gedruckt. Die Platten wurden über 14 Tage kultiviert. Die Viabilität wurde mithilfe eines über 19 h einwirkenden AlamarBlue-Assays bestimmt. Die Viabilität ist abzüglich der Viabilität der Leerkontrollen dargestellt. Der Standardfehler ist eingezeichnet. Die Viabilitätswerte der zellbeladenen Konstrukte zeigten über die 14 Tage einen Anstieg.

Ergebnisse

5.4.3.2. Zellviabilität von Fibroblasten in Gel Ma A

Die Viabilität der Monokultur von Fibroblasten im gedruckten Konstrukt in *Gel Ma A* wurde über 14 Tage untersucht. Wie oben genannt erfolgte die Messung der Zellviabilität der Fibroblasten in *Gel Ma A* in unterschiedlichen Zellkonzentrationen und in unterschiedlich großen Konstrukten. Die Darstellung erfolgt abzüglich der Viabilitätswerte der Leerkontrollen. Die zelllosen Konstrukte wiesen über den Verlauf von 14 Tagen keine Tendenzen auf und sind deshalb hier auf Höhe der Nulllinie nicht eingezeichnet. Die Viabilitätswerte lagen für den Beobachtungszeitraum zwischen etwa 1 und 16 relativen Einheiten. Es waren in allen Konstrukten vitale Zellen vorhanden. Beinahe alle Konstrukte zeigen einen ähnlichen Anstieg der Viabilität, die mittels *AlamarBlue* Assay gemessen wurde. In Abhängigkeit von der Zellkonzentration variiert die Zellviabilität zu Beginn der Messung. Die Zell-Konstrukte mit höheren Zellkonzentrationen erreichen höhere Ausgangswerte als die Zell-Konstrukte mit niedrigerer Zellkonzentration (Grafik 17).



Grafik 17, Zellviabilität von Fibroblasten in Gel Ma A (n=3). Es wurden 96-Well-Platten mit je fünf Konstrukten einer bestimmten Zellkonzentration in verschiedenen Konstruktgrößen bedruckt und über 14 Tage inkubiert. Die Viabilität wurde mithilfe eines über 19 h einwirkenden AlamarBlue-Assays bestimmt. Die Viabilität ist abzüglich der Viabilität der Leerkonstrukte dargestellt. Der Standardfehler ist eingezeichnet. Die Viabilitätswerte der zellbeladenen zeigen über 14 Tage einen konstanten Anstieg.

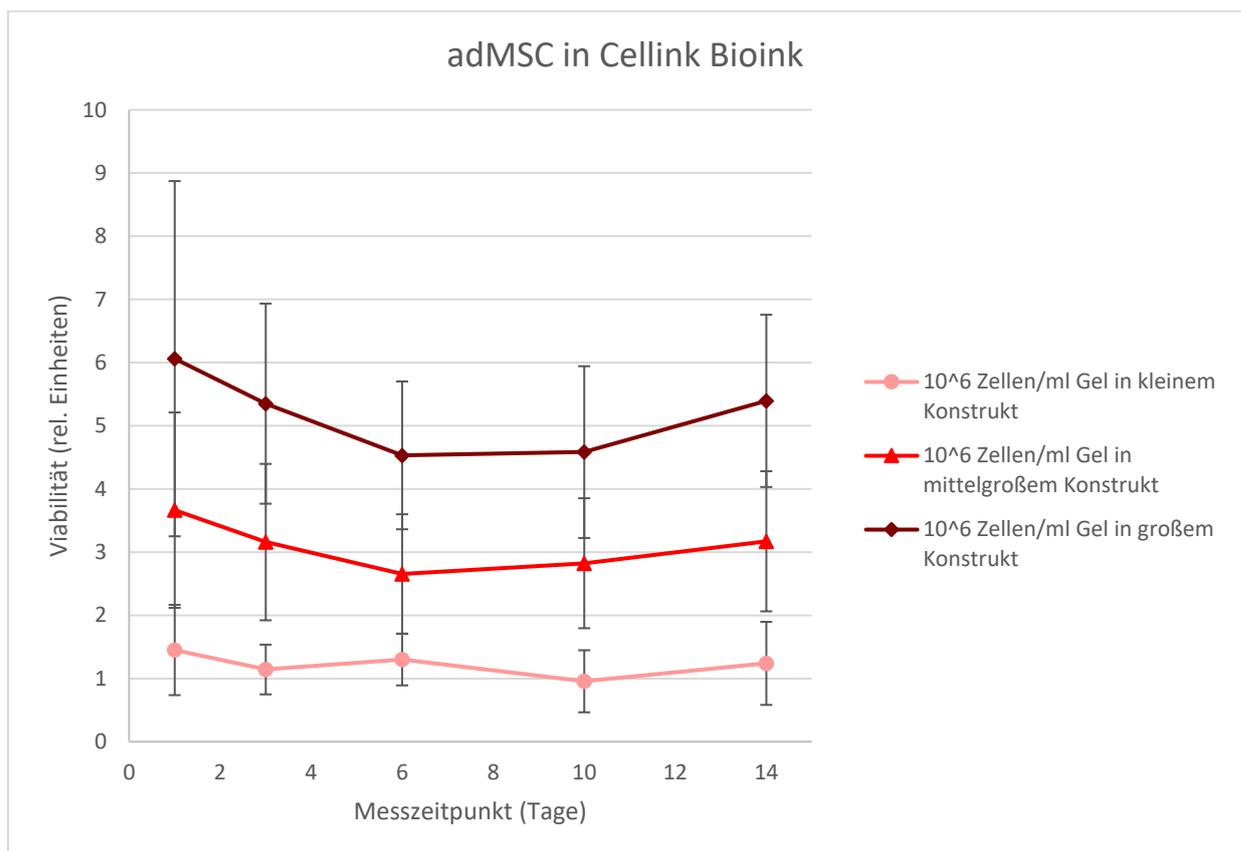
Ergebnisse

5.4.4. adMSC-Viabilität im gedruckten Konstrukt

5.4.4.1. adMSC-Viabilität in Cellink Bioink

Die Viabilität der Monokultur der adMSC wurde im gedruckten Konstrukt mit *Cellink Bioink* über 14 Tage untersucht. Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte mit Hilfe eines *AlamarBlue*-Assays nach 19 h Einwirkzeit. Die Werte sind abzüglich der Viabilität der Leerkontrolle dargestellt.

Die zellfreien Konstrukte zeigten über den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen keine Veränderung und sind deshalb hier als Nulllinie eingezeichnet. Alle zellbeladenen Konstrukte zeigen über den Zeitraum von 14 Tagen eine Viabilität mit Viabilitätswerten zwischen 1 und 6 relativen Einheiten. Die Zellviabilität sinkt von Tag 1 zu Tag 6 etwas ab, bleibt dann konstant und zeigt zu Tag 14 wieder einen leichten Anstieg. Alle drei zellgefüllten Konstrukte zeigen einen ähnlichen Verlauf (Grafik 18).

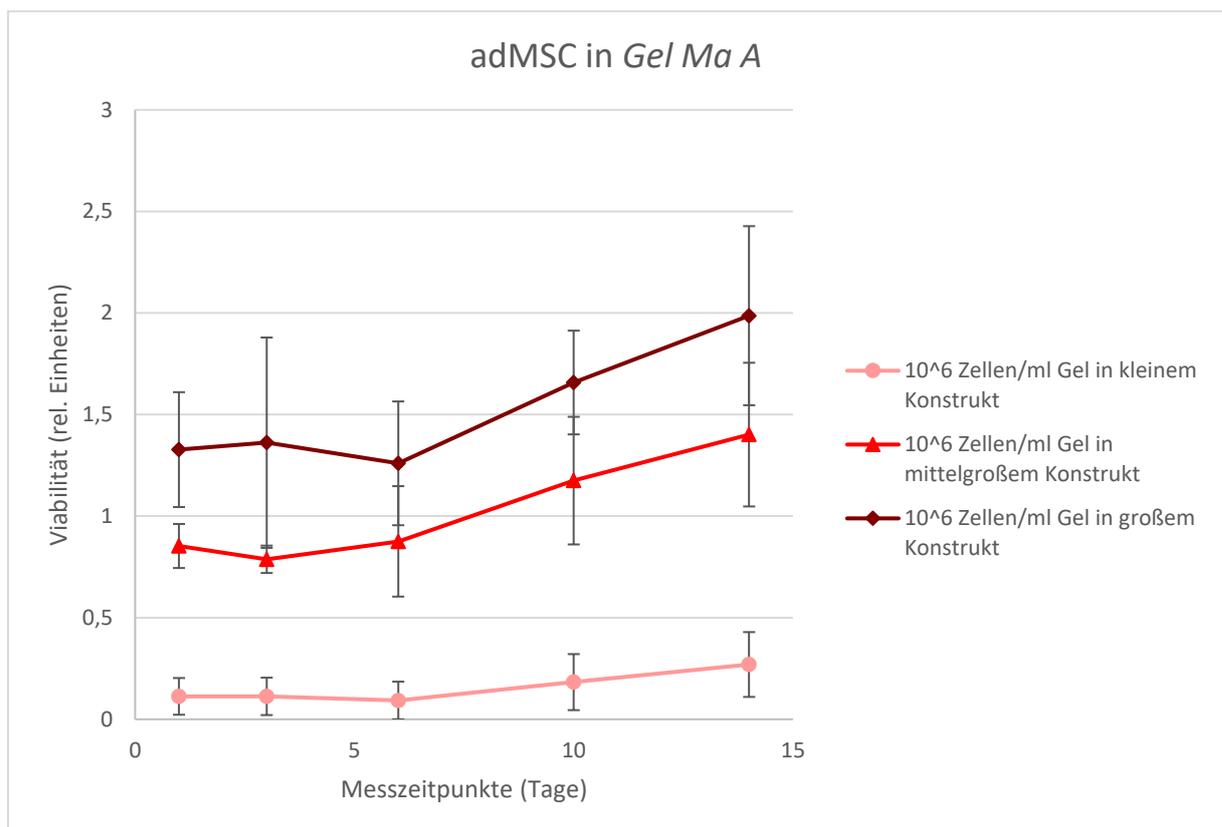


Grafik 18, Zellviabilität von adMSC in Cellink Bioink (n=3). Es wurden 96-Well-Platten mit je fünf Konstrukten in verschiedenen Konstruktgrößen bedruckt und über 14 Tage inkubiert. Die Viabilität wurde mithilfe eines über 19 h einwirkenden AlamarBlue-Assays bestimmt. Die Viabilität ist abzüglich der Viabilität der Leerkonstrukte dargestellt. Der Standardfehler ist eingezeichnet. Die Viabilitätswerte der zellbeladenen Konstrukte sind für den Messzeitraum deutlich positiv.

5.4.4.2. *adMSC-Viabilität in Gel Ma A*

Die Viabilität der Monokultur der adMSC wurde im gedruckten Konstrukt mit *Gel Ma A* über 14 Tage untersucht. Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte mit Hilfe eines *AlamarBlue*-Assays nach 19 h Einwirkzeit. Die Leerkontrollen zeigen über den Beobachtungszeitraum keine Veränderung, daher sind die Werte abzüglich der Werte der Leerkontrollen aufgeführt.

Die mittelgroßen und großen zellbeladenen Konstrukte zeigen über den Zeitraum von 14 Tagen vitale Zellen mit Viabilitätswerten zwischen 0,75 und 2 relativen Einheiten. Die Viabilität der mittelgroßen und großen Konstrukte mit 10^6 Zellen/ml scheint von Tag 6 zu Tag 14 synchron anzusteigen. Das kleine, zellbeladene Konstrukt unterscheidet sich nicht deutlich von der Nulllinie (Grafik 19).



Grafik 19, Zellviabilität von adMSC in Gel Ma A (n=3). Es wurden 96-Well-Platten mit je fünf Konstrukten in verschiedenen Konstruktgrößen bedruckt und über 14 Tage inkubiert. Die Viabilität wurde mithilfe eines über 19 h einwirkenden AlamarBlue-Assays bestimmt. Die Viabilität ist abzüglich der Viabilität der Leerkonstrukte dargestellt. Der Standardfehler ist eingezeichnet. Insbesondere die Viabilitätswerte der mittelgroßen und großen Konstrukte sind über den Messzeitraum von 14 Tagen deutlich positiv.

Ergebnisse

5.5. Viabilität von adMSC und Endothelzellen in Bi-Kultur

Nachdem das Überleben der Monokultur der adMSC im gedruckten Konstrukt über 14 Tage nachgewiesen war, wurden adMSC zusammen mit HDMEC in Bi-Kultur gedruckt. Zum besseren Überleben der Endothelzellen wurden diese auf *Microcarrier* geladen, da C. Lahmers die Bi-Kultur von Endothelzellen und Fibroblasten auf diese Art etabliert hat [73]. Die Möglichkeit, die Zellen *in vitro* mittels einer Fluoreszenzmarkierung zu beobachten, musste leider aufgrund einer Eigenfluoreszenz der *Microcarrier* und einem nicht nachweisbaren Unterschied zwischen *Celltracker red* (638 nm) und *Celltracker green* (488 nm) verlassen werden. Die Viabilität der Bi-Kulturen wurde mittels eines 24 h einwirkenden *AlamarBlue*-Assays untersucht (Grafik 20).



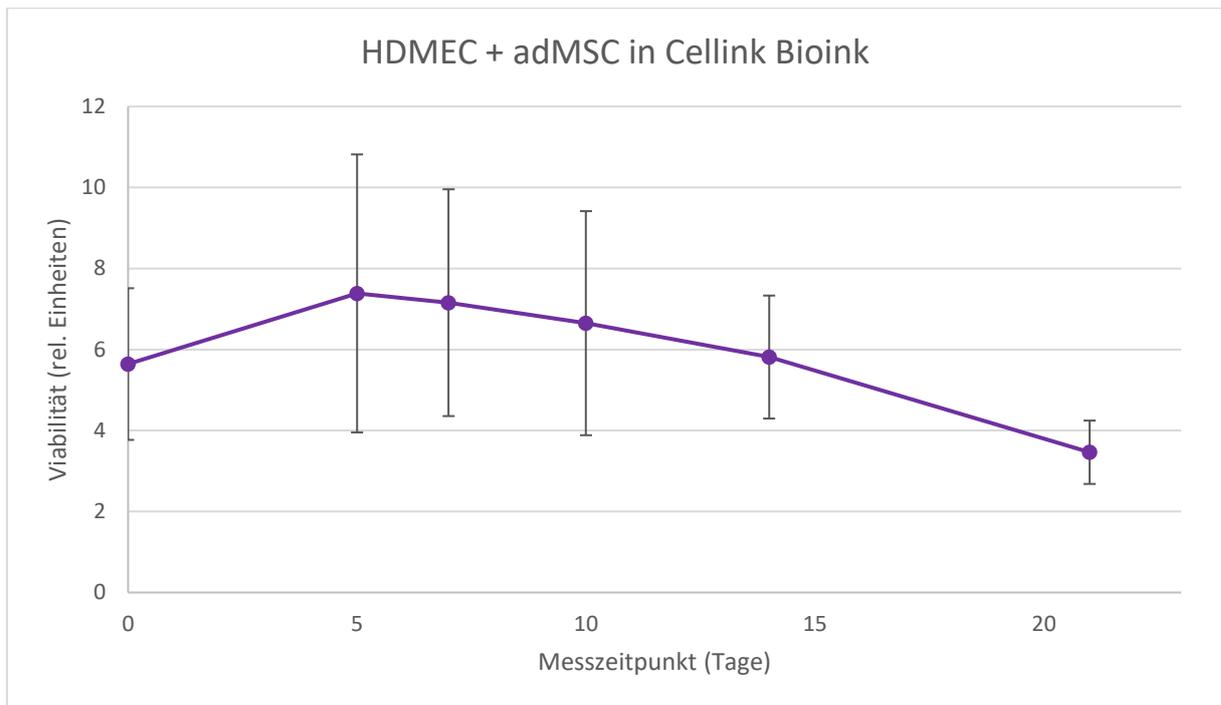
Grafik 20, Beispielhafte gedruckte Konstrukte Bi-Kultur in Cellink Bioink, obere Zeile mit AlamarBlue nach 24 h Einwirkzeit. Die Konstrukte oben links sind mit Bi-Kultur gefüllt, oben rechts die Leerkontrollen zum Vergleich. Die Bi-Kultur-beladenen Konstrukte zeigen eine deutliche rosa Verfärbung des Zellmediums.

5.5.1. Viabilität der Bi-Kultur HDMEC + adMSC in Cellink Bioink

Die Untersuchung der Viabilität der gedruckten Konstrukte der Bi-Kultur aus adMSC und HDMEC in *Cellink Bioink* erfolgte mittels eines *AlamarBlue*-Assays mit einer Einwirkzeit von 24 h. Die Leerkontrollen zeigen über den Beobachtungszeitraum keine Veränderung, daher sind die Werte abzüglich der Werte der Leerkontrollen aufgeführt.

Über den kompletten Zeitraum von 21 Tagen liegen die Viabilitätswerte der Bi-Kultur deutlich über der Nulllinie. Die Viabilitätswerte der Bi-Kultur liegen zwischen etwa 7,5 und 3,5 relativen Einheiten. Die Viabilität steigt an Tag 5 an und fällt dann bis hin zu Tag 21 ab (Grafik 21).

Ergebnisse



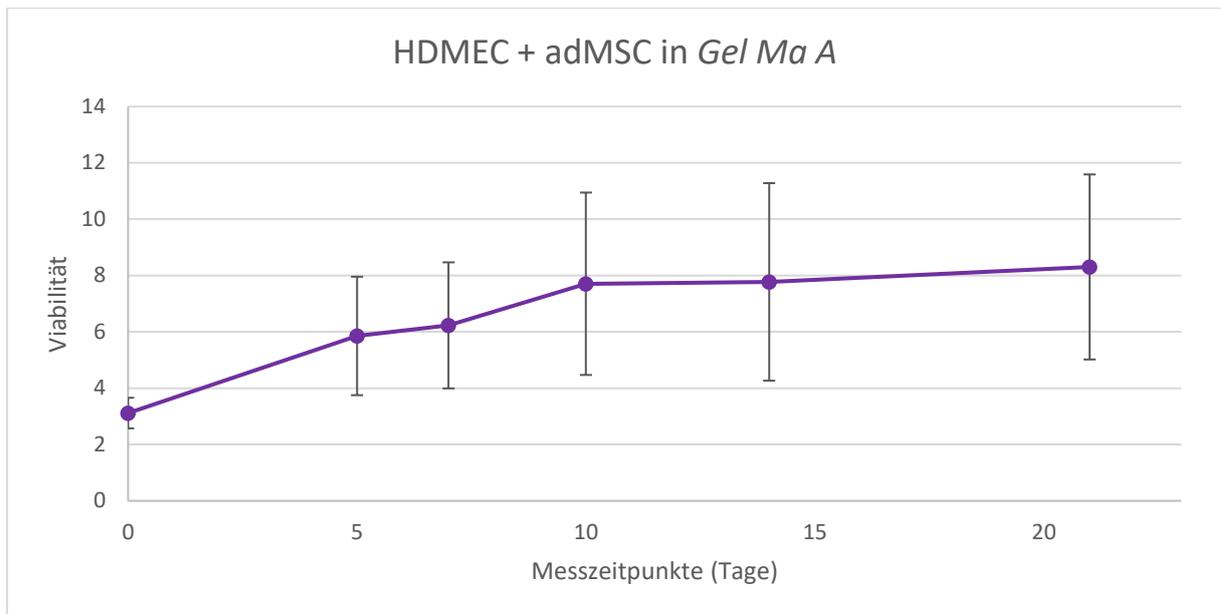
Grafik 21, Viabilität von HDMEC und adMSC Bi-Kultur in Cellink Bioink, mit Standardfehler. Es wurden 6x6 mm große, zweilagige Gitter mit $1,5 \times 10^6$ HDMEC/ml auf Microcarriern und 500 000 adMSC/ml in Cellink Bioink gedruckt. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe eines 24 h einwirkenden AlamarBlue-Assays determiniert und ist abzüglich der Viabilitätswerte der Leerkontrolle dargestellt. Der Standardfehler ist eingezeichnet. Die Viabilitätswerte der Bi-Kultur sind über den Messzeitraum von 21 Tagen deutlich positiv und scheinen ab Tag 5 eine Abwärtstendenz zu zeigen.

5.5.2. Viabilität der Bi-Kultur HDMEC + adMSC in Gel Ma A

Die Untersuchung der Viabilität der gedruckten Konstrukte mit *Gel Ma A* und der Bi-Kultur aus adMSC und HDMEC erfolgte mittels eines *AlamarBlue*-Assays mit einer Einwirkzeit von 24 h. Die Werte der Leerkontrolle über den Beobachtungszeitraum keine Veränderung aufwiesen sind die Viabilitätswerte der Bi-Kultur abzüglich der Viabilitätswerte der Leerkontrolle dargestellt.

Über den Zeitraum von 21 Tagen zeigen sich in der Bi-Kultur Viabilitätswerte oberhalb der Nulllinie. Es zeigen sich also über 21 Tage vitale Zellen mit Viabilitätswerten zwischen etwa 3 und 8,5 relativen Einheiten. Die Viabilität der Bi-Kultur in *Gel Ma A* scheint über den Zeitraum von 21 Tagen kontinuierlich anzusteigen (Grafik 22).

Ergebnisse

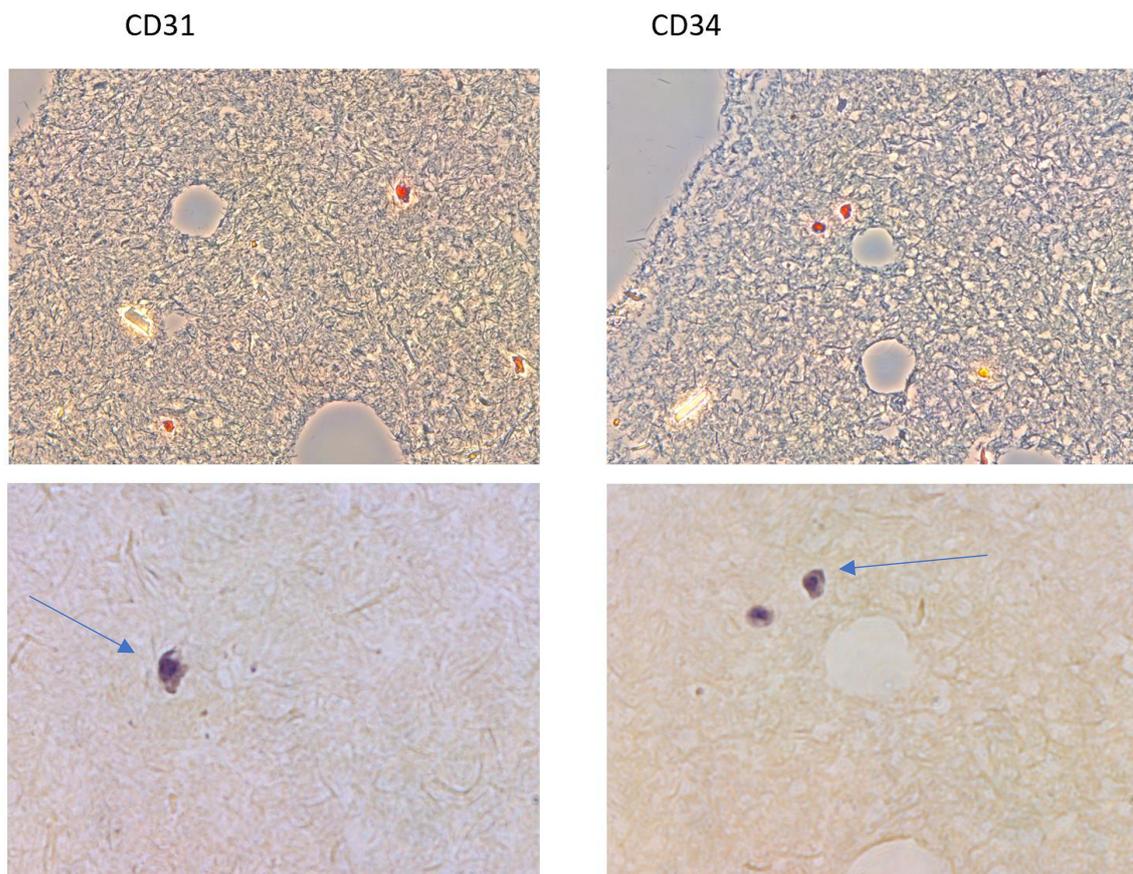


Grafik 22, Viabilität von HDMEC und adMSC Bi-Kultur in Gel Ma A, mit Standardfehler. Es wurden 6x6 mm große, zweilagige Gitter mit $1,5 \times 10^6$ HDMEC / ml auf Microcarriern und 500 000 adMSC / ml in Gel Ma A gedruckt. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe eines 24 h einwirkenden AlamarBlue Assays determiniert und ist abzüglich der Viabilität der Leerkontrolle dargestellt. Der Standardfehler ist eingezeichnet. Die Viabilitätswerte der Bi-Kultur sind für den Messzeitraum von 21 Tagen deutlich positiv.

Ergebnisse

5.6. Histologie der gedruckten Bi-Kultur-Konstrukte

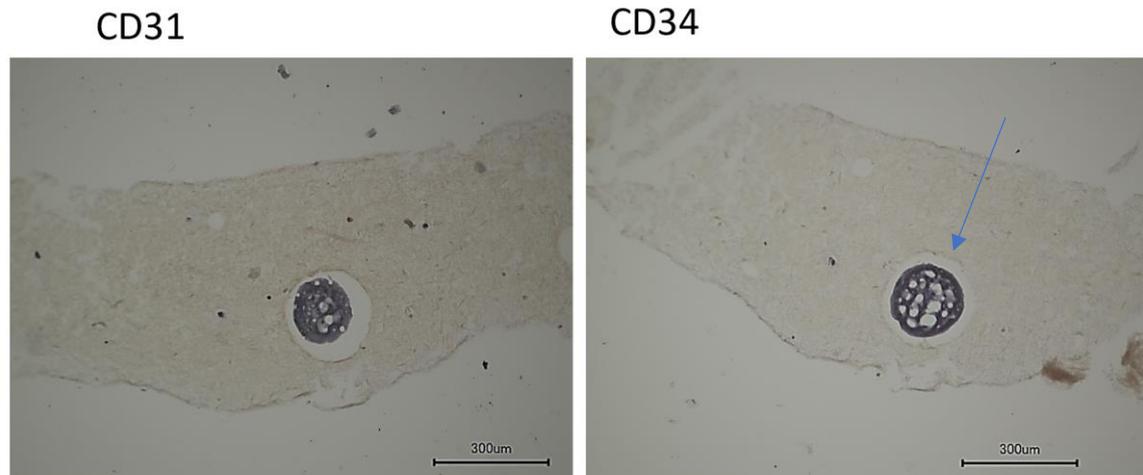
Um die Verteilung der Zellen in der Bi-Kultur zu beurteilen, wurden die Konstrukte in Paraffin fixiert, geschnitten und CD31 und CD34 immunhistochemisch gefärbt. Für die abgebildete Färbung wurden gezielt Konstrukte ausgewählt, die im *AlamarBlue*-Assay sehr hohe Werte erzielten. Die Immunhistochemische Färbung der Schnitte erbrachte den Nachweis einzelner Zellen in *Cellink Bioink*. Eine klare Positivität für CD31 und CD34 konnte nicht erbracht werden (Grafik 23).



Grafik 23, CD31 und CD34 immunhistochemisch gefärbtes Konstrukt, Bi-Kultur in *Cellink Bioink* nach fünf Tagen Kultivierung. Es sind einzelne Zellen auf den Schnitten zu erkennen (mit Pfeilen markiert). Obere Reihe: 10x Objektiv, untere Reihe 20x Objektiv.

Die *Microcarrier* wurden durch die Gegenfärbung mit Hämalaun sehr stark angefärbt (Grafik 24).

Ergebnisse



Grafik 24, CD31 und CD34 immunhistochemisch gefärbtes Konstrukt einer Bi-Kultur in Cellink Bioink an Tag 22. Während der Microcarrier mit der Hämalun-Gegenfärbung stark angefärbt wird, sind in dem gefärbten Schnitt keine Zellen zu sehen. Der Microcarrier ist exemplarisch rechts im Bild mit einem Pfeil markiert.

6. Diskussion

Das Mammakarzinom und seine operative Entfernung schaffen selbst bei brusterhaltender Therapie Defekte in der Brust, die eine Rekonstruktion notwendig machen können [81]. Während bislang herkömmliche rekonstruktive Verfahren die Rekonstruktion ermöglichen, bietet der Bereich des *Tissue Engineering* neue Möglichkeiten, autologes Gewebe für die Rekonstruktion der weiblichen Brust *in vitro* zu generieren. Hiermit könnte sowohl eine aufwändige Operation zur autologen Rekonstruktion der Brust umgangen wie auch die Nebenwirkung eines heterologen, beispielsweise silikonbasierten Brustersatzes, vermieden werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Möglichkeiten des 3D-Biodrucks zur Rekonstruktion der Brust und zum Schaffen von Brustfettgewebsäquivalenten eruiert und etabliert werden. Insbesondere die Etablierung einer Bi-Kultur von adMSC und Endothelzellen und die Vorbereitung einer Tri-Kultur im gedruckten Konstrukt stand im Mittelpunkt. Mittels *Tissue Engineering* und 3D-Biodruck erzeugte Weichgewebsäquivalente bieten eine Erweiterung der Verfahrenspalette der rekonstruktiven Chirurgie. Durch *in-vitro* generierte, autologe Transplantate könnten hier Operationsrisiken minimiert werden.

6.1. 3D-Biodruck

Der 3D-Biodruck ist ein sich rapide entwickelndes, aber noch relativ neues Gebiet der medizinisch-biologischen Forschung. Während 2007 lediglich eine Veröffentlichung pro Jahr zum Suchbegriff „3d bioprinting“ bei PubMed erscheint, sind es im Jahr 2021 bereits 752 [82]. Durch implantierbare, avitale dreidimensional gedruckte Konstrukte rückt die rekonstruktiv-therapeutische Anwendung in die nähere Zukunft [83]. Die Möglichkeiten der autologen Rekonstruktion der Brust mittels *in vitro* generiertem Gewebe sind sehr groß, trotzdem müssen die Grundlagen zur Herstellung eines Brustfettgewebsäquivalents vorher festgehalten werden. Für Brustrekonstruktionen wird ein gewisses Volumen an Brustfettgewebsäquivalent benötigt. Bei Konstrukten, die eine gewisse Größe überschreiten, ist das Überleben vor allem der innersten Zellen im Konstrukt nicht ohne Gefäßstruktur zur Sauerstoff- und Nährstoffversorgung möglich. Es gilt den Druck von Fettgewebsstammzellen mit den Erkenntnissen aus den Vorarbeiten zur Prävascularisierung zu vereinen und so prävascularisierte Fettgewebiskonstrukte dreidimensional zu drucken.

Diskussion

In dieser Arbeit wurde durch den erfolgreichen 3D-Biodruck einer Mono-Kultur von Fibroblasten und Fettgewebstammzellen und der Bi-Kultur von Endothel- und Fettgewebstammzellen ein wichtiger Schritt in Richtung des gedruckten Fettgewebsequivalents unternommen. Es konnte gezeigt werden, dass mit den verwendeten Methoden das Drucken vitaler Konstrukte mit Fibroblasten und mit einer Bi-Kultur aus Endothelzellen und adMSC möglich ist.

Nozzle Clogging

In Abhängigkeit vom Durchmesser des Spitzenendes, vom Druck und von der Viskosität der Tinte, kann diese bereits in der Spitze aushärten und diese damit verstopfen. Dies wird als *Nozzle Clogging* bezeichnet. Das *Nozzle Clogging* war insbesondere zu Beginn dieser Arbeit ein relevantes Problem, das die Druckbarkeit der Tinte, das Überleben der Zellen und das Standardisieren der gedruckten Konstrukte beeinflusste. Vor allem die Temperatur hatte einen entscheidenden Einfluss auf die Viskosität der Tinten. Ist es zum *Nozzle Clogging* gekommen, muss der Druck abgebrochen und eine neue Spitze aufgesetzt werden. Anschließend muss häufig der Drucker komplett neu kalibriert werden. Auch hat der Drucker bis zum Verstopfen der Spitze oft schon einen Teil des zu druckenden Konstrukts ausgedruckt. Hier gilt es dann, die Teile aus dem G-Code, die der Drucker schon abgefahren hat, zu löschen und lediglich mit Reisebewegungen zum Weiterfahren des Druckers zu füllen; andernfalls druckt der Drucker gewisse Teile des Konstrukts doppelt. Das *Nozzle Clogging* ist ein nicht zu unterschätzendes Problem im Extrusion-basierten 3D-Biodruck und kann möglicherweise durch veränderte Tinten oder optimierte Druckbedingung behoben werden [55]. Das Verstopfen der Druckerspitze lässt sich vermeiden, wenn die im Methodenteil vorgeschriebenen Schritte sorgsam durchgeführt werden, die Temperatur der Biotinte und des Druckkopfs korrekt eingestellt sind und die Tinte im Laufe des Drucks nicht zu lange in der Druckspitze steht und somit abkühlt.

Verwendung der richtigen Tinten

Kommerzielle Anbieter von 3D-Biodruckern bieten verschiedene Tinten zum 3D-Biodruck an. In dieser Arbeit wurde sich auf eine Standardtinte des Herstellers *Cellink* und eine auf Gelatine basierte Tinte festgelegt. Die Standardtinte des Herstellers *Cellink Bioink* wurde aufgrund ihrer einfachen Anwendung verwendet. Die Tinte *Gel Ma A*

Diskussion

wurde aufgrund der Möglichkeit, eine auf Gelatine basierende Tinte, die sich aber zusätzlich noch mit der *Binding Solution* aushärten ließ, verwendet. So konnte ein Vergleich der beiden Biotinten stattfinden, ohne dass die Zellen in der auf Gelatine basierenden Tinte einer UV-Belastung ausgesetzt waren. Die Möglichkeit eines 3D-gedruckten Konstrukts auf Basis eines Kollagen-Gels musste leider schon zu Beginn der Arbeit aus dieser Arbeit ausgeklammert werden, da der 3D-Biodrucker keine Möglichkeit besaß, die Druckköpfe zu kühlen und damit die verwendete, ausschließlich auf Kollagen basierende Tinte schon in der Druckkartusche aushärtete. Im Folgenden sollen die verwendeten Tinten hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit beschrieben, bewertet und diskutiert werden.

Verwendung von Cellink Bioink

Die ideale Druckbarkeit der Standardtinte *Cellink Bioink* der Firma *Cellink* ist bei Raumtemperatur. Die Konstrukte sind formstabil und lassen sich mittels der *Ionic Binding Solution* aushärten. Je nachdem, welche Druckspitze verwendet wird und welche Zellen bzw. welche Bestandteile in das Gel gemischt wurden kommt es zum Verstopfen der Spitze. Unter Anderem verstopfte in dieser Arbeit die 250 µm Spitze beim Drucker der Bi-Kultur aus HDMEC und adMSC, wobei die verwendeten *Microcarrier* am ehesten die Spitze verstopften. Je nach Druckgeschwindigkeit werden von der Firma *Cellink* für das Drucken mit 250 µm Spitze von Tinte ohne Zellen *Pressure* von 8 bis 12 kPa, für das Drucken von Tinte mit Zellen zwischen 12 und 17 kPa vorgeschlagen [84]. Die in dieser Arbeit typischerweise angewendeten 15 kPa liegen für das Drucken von Tinte mit Zellen also im Mittelfeld. Die *Bioink* erreicht ihre optimale Druckbarkeit schon bei Raumtemperatur. Dies macht die Benutzung einfach. Um den optimalen *Pressure* einzustellen, empfiehlt die Firma *Cellink* den *Pressure* derart zu erhöhen, dass ein laminarer Fluss entsteht. Es wurde sich an dem vorgegebenen *Pressure* zwar orientiert, die genaue Nachjustierung war aber dennoch nötig. Bis ein laminarer Fluss erreicht wurde, sind häufig schon große Mengen Tinte verloren gegangen. Da mit kleinen Konstrukten und somit kleineren Mengen Tinte gedruckt wurde (0,5 ml pro Kartusche), ist die Tinte aus der Kartusche mit dem Einstellen eines laminaren Flusses komplett entleert. Folgende Lösung wurde umgesetzt. Der Druck wurde so eingestellt, dass ein sehr langsamer, aber schon laminarer Fluss entsteht. Drucken ließ sich mit diesem *Pressure* noch nicht, da die Drucklinie abbricht. Danach wurde die Verschlussklappe wieder geschlossen und der Druck noch um 2-3 kPa erhöht. So war ein konstantes

Diskussion

Druckergebnis möglich. Die angegebene Druckvorgabe direkt zu verwenden war aufgrund des Risikos des großen Tinten- und Zellverlust zu riskant.

Verwendung von Gel Ma A

Gel Ma A ist bei Raumtemperatur fest, sie ließ sich am besten verwenden, wenn die Tinte auf etwa 25-28 °C aufgewärmt war. Für den Druck eigneten sich 26 °C [77]. Für *Gel Ma A* hatten geringe Temperaturunterschiede der Tinte große Auswirkungen auf die Viskosität. *Gel Ma A* lässt sich mit der Ionic Solution oder mittels UV-Licht aushärten. Nach dem Aushärten mittels UV-Licht muss die Spitze gewechselt werden, da es in der Kombination aus geschlossener Druckklappe für etwa 1-2 min und UV-Licht in der Druckkammer zum Nozzle Clogging kommt. Die Stabilität der Konstrukte aus *Gel Ma A* schien unabhängig von der Methode des Aushärtens zu sein. *Gel Ma A* ist eine durchsichtige Tinte. Da vor allem für die Monokulturen mit sehr kleinen Konstrukten gearbeitet wurde, waren die Konstrukte oft nicht klar zu erkennen. Vor allem zu Beginn der Arbeit wurden die Konstrukte so z.T. aus der Platte heraus pipettiert.

Insbesondere bei *Gel Ma A* stellt das *Nozzle Clogging* ein Problem dar. Während die optimale Druckbarkeit bei 26 °C liegt, liegt die optimale Temperatur zum Mischen der Tinte mit den Zellen bei Temperaturen bei etwa 35°C [77]. Um das Zellüberleben zu verbessern, wurden die mit Zellen beladenen Tinten möglichst schnell, also in unter 30 min, gedruckt. Werden aber mehrere, verschiedene Kartuschen gedruckt, ist es vorgekommen, dass die Kartusche über die veranschlagte Zeit bei Raumtemperatur stand, sodass sie unter die vorgegebenen 26 °C abkühlte. Die beheizten Druckköpfe konnten das Problem zu einem Teil lösen, allerdings brauchen auch die Druckköpfe eine gewisse Zeit, um die Tinte wieder aufzuheizen, bzw. die richtige Temperatur innerhalb der Tinte einzustellen. Hierfür werden 10-20 min von der Firma *Cellink* veranschlagt [77]. Die Tinte wurde aufgrund der verwendeten Primärzellen lediglich 10 min im beheizten Druckkopf aufgewärmt. Dies hatte zur Folge, dass die Temperatur während des Drucks zum Teil nicht konstant war. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit des *Nozzle Cloggings* mit einer höheren Temperatur geringer als bei tieferen Temperaturen. Somit ist die Einstellung der Temperatur für *Gel Ma A* nicht nur für das Zellüberleben wichtig, sondern auch für die Druckbarkeit der Tinte und die Wahrscheinlichkeit eines Verstopfens der Spitze.

Verwendung von Kollagen-Gel

Die Verwendung von dem selbst angesetzten bovinen Kollagen-Gel als druckbare Tinte mit lebenden Zellen war mit der beschriebenen Methode für den *Inkredibler*

Diskussion

3D-Drucker nicht möglich. Das Kollagen-Gel härtet bei Temperaturen oberhalb von 4 °C aus. Weder waren die Druckköpfe des *Inkredibile+* kühlbar noch war das Druckbett beheizbar. Der Druck wurde hierdurch kompliziert, da bei vorher gekühltem Gel das Gel einfach herauslief, während es bei Zimmertemperatur schon in der Kartusche und in der Spitze aushärtete. Dadurch, dass das Druckbett nicht beheizbar war, erwärmte sich das Kollagengel nach dem Druck auch nur sehr langsam und blieb in seiner Form nicht stabil. Das Drucken von diesem bovinen Kollagen-Gel brachte gegenüber dem direkten Pipettieren keine Vorteile, wenn mit dem *Inkredibile+* gedruckt wurde. Das Zellüberleben im Kollagen-Gel bei 4 °C wurde belegt [13]. Das bovine Kollagen-Gel ist als Gel möglicherweise eher als Strukturgeber geeignet, als um es mit Zellen zu vermischen und direkt zu Drucken. In anderen Arbeiten zeigt sich die Druckbarkeit von allein auf kollagenbasierten Tinten ausschließlich mit besonderen Systemen, die ein Aushärten des Kollagens in einem Stützmedium ermöglichen. Dieses Stützmedium kann in einem zweiten Schritt ausgewaschen werden [85].

6.2. adMSC Isolierung und Differenzierung

Die Isolierung der adMSC wurde von Isabel Brantsch etabliert [13] und für diese Arbeit standardisiert. Die beschriebene Methode war zur Isolierung der adMSC aus (Brust-)Fettgewebe geeignet. Die isolierten Zellen wuchsen und proliferierten in den Zellkulturflaschen, überlebten das Passagieren und konnten auch mittels Adipozyten-Differenzierungsmedium der Firma *Pelo Biotech* differenziert werden. Es stellte sich allerdings die Frage, inwieweit die isolierten Zellen als adMSC-Monokultur klassifiziert werden konnten oder ob es sich um eine Mischkultur handelte. Hierfür wurde CD34 als möglicher Oberflächenmarker zur Bead-Isolation der Zellkulturen untersucht. CD34 ist als möglicher Differenzierungsfaktor umstritten, da es nur im Gewebe von MSC exprimiert wird, in Zellkultur geht der Marker verloren [86]. Diese These konnte durch diese Arbeit unterstützt werden, da die auf die Objektträger aufzentrifugierten Zellen direkt nach der Isolierung durch CD34-Antikörper immunzytochemisch angefärbt werden konnten. Differenzierte Zellen zeigten keine immunzytochemische Reaktion auf die CD34-Antikörperfärbung. Für die Isolierung der adMSC ist also die Bead-Isolation möglich, allerdings nur, wenn sie direkt während der Isolation aus dem Brustfettgewebe durchgeführt wurde. Da die Zellen ohne Bead-Isolation auch in der Mischkultur überwiegend CD34+ waren, konnte auf die Bead-Isolation verzichtet werden. Hier gilt es in weiteren Versuchen herauszufinden, wie hoch der Anteil der adMSC-Kulturen ist, die nicht Bead-isoliert und dann offensichtlich von Fibroblasten überwachsen werden.

Diskussion

Zur Bestätigung der Fettgewebszellendifferenzierung der adMSC ist die *Oil Red O*-Färbung geeignet [87]. Hierbei werden Fettsäuren innerhalb der Zellen mittels des *Oil Red O*-Farbstoffs rot angefärbt. Ein standardisiertes Protokoll zur *Oil Red O*-Färbung von adMSC und insbesondere von Schnitten der 3D-gedruckten Konstrukte gilt es in Folgearbeiten noch zu etablieren. Außerdem sollte die *Oil Red O*-Färbung der gedruckten Konstrukte ohne Entwässern erfolgen, sodass die Fettsäuren nicht im Entfettungsprozess herausgewaschen werden.

6.3. Zellviabilitätsmessung mittels MTT-Assay

Für die erste Viabilitätsmessung wurde ein MTT-Assay angewendet. Die Ergebnisse dabei waren diffus. So waren zum Teil bei den Konstrukten mit geringerer Zellkonzentration wesentlich höhere Viabilitätswerte über die MTT-Umsetzung zu messen. Außerdem hatten sich im Verlauf auch die Messwerte der Leerkontrolle verändert. Auch in anderen Arbeiten der Arbeitsgruppe ist aufgefallen, dass der MTT-Assay für die Messung der Zellviabilität in 3D-gedruckten Konstrukten unzuverlässig war [73]. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen einer Studie mit Fibroblasten der Maus von Shi et. al. [88]. Hier war in einer Alginate-haltigen Biotinte eine Zellviabilität konstant über einen Zeitraum von 14 Tagen nachweisbar. Allerdings wurden in der Studie von Shi et. al. 5×10^6 Zellen/ml Biotinte verwendet, während in dieser Arbeit maximal 2×10^6 Zellen/ml Biotinte verwendet wurden. Möglicherweise war die Viabilität in den hier durchgeführten Versuchen aufgrund der niedrigen Zellzahl unterhalb der sicheren Nachweisgrenze des verwendeten MTT-Assays.

Ein weiterer Nachteil des MTT-Assays für die Viabilitätsuntersuchung ist, dass für jeden Versuchstag ein einzelner Ansatz angesetzt sowie ein neues Konstrukt gedruckt werden musste, da die Zellen den Assay nicht überleben. Der Druck von zwei exakt identischen Konstrukten war durch temperatursensible Druckbedingungen, das beschriebene Verstopfen der Druckerspitze (*Nozzle clogging*) und das Drucken von sehr kleinen Konstrukten nur schwer möglich. Es ließen sich zwar für die einzelnen Messzeitpunkte zwei verschiedene Platten bedrucken, die Menge an tatsächlich gedruckter Tinte war aber nur bedingt reproduzierbar. Es kann festgehalten werden, dass sich die Viabilität der verwendeten Konstrukte mittels des MTT-Assays nur ungenau abbilden ließ [73] und ein zeitlicher Verlauf desselben Konstrukts nicht darstellbar war. Da die Tinten sehr teuer in der Beschaffung sind und die Kultivierung großer Mengen an Zellen sehr aufwändig ist, ist die Wiederverwendung der Konstrukte essenziell für einen

Diskussion

balancierten Kosten- / Nutzeneffekt. Aus diesem Grund wurden für weitere Versuche etwas größere Konstrukte gedruckt und die Viabilität mittels *AlamarBlue*-Assay gemessen, sodass die Konstrukte wiederverwendet werden konnten. So ließ sich eine Auswertung der Viabilität über den Messzeitraum von 14 bzw. 21 Tagen zuverlässiger treffen. Für die Messung der Viabilität von Tumorzelllinien unterscheiden sich ein *AlamarBlue*-Assay und das MTT-Assay nur geringfügig [89].

6.4. Zellviabilitätsmessung mittels *AlamarBlue*

In dem Versuch zur Bestimmung der optimalen Einwirkzeit von *AlamarBlue* für die Zellviabilitätsversuche zeigt sich, dass auch nach 24 h in den Wells mit den größten Konstrukten kein Plateau erreicht wurde. Weiterhin zeigte sich eine Zunahme der Spezifität der Viabilitätsmessung, da die Abstände zwischen den einzelnen Konstrukten größer werden. Selbst nach 24 h zeigten die zellfreien Konstrukte kaum Veränderung in der gemessenen Fluoreszenz. Sowohl nach 19 h als auch nach 24 h Einwirkzeit scheint der Farbumschlag der Zellen sich noch in einer exponentiellen Wachstumsphase zu befinden. Nach Rampersad et. al. wird das Ablesen der Graphen zu diesem Zeitpunkt empfohlen [90]. Hiermit lässt sich bestätigen, dass die Konstrukte zur besseren Spezifizierung ihrer Viabilität über 19 h und über 24 h mit *AlamarBlue* behandelt werden können.

Da zum Teil mit sehr kleinen Konstrukten gearbeitet wurde, konnten mithilfe der 19 h bzw. 24 h Einwirkzeit spezifischere Werte für die Zellviabilität herausgearbeitet werden. Die 19 h Einwirkzeit wurde für alle Zellviabilitätsversuche in Mono-Kultur angewandt, für die Bi-Kultur-Versuche wurde zur besseren Spezifizierung der Werte mit einer Einwirkzeit von 24 h gearbeitet.

6.5. Zellviabilität von Fibroblasten in gedruckter Mono-Kultur

Die Fibroblasten überlebten sowohl in *Cellink Bioink* als auch in *Gel Ma A*. Es schien, dass die Zellen in *Gel Ma A* ein stärkeres Wachstum zeigten, wohingegen sie in *Bioink* schon mit einer hohen Viabilität starteten, insbesondere in großen Konstrukten. Für die weitere Anwendung des 3D-Biodrucks im Labor ist besonders relevant, dass sowohl in *Bioink* als auch im *Gel Ma A* eine Negativkontrolle mittels *AlamarBlue* in den zellfreien Konstrukten möglich war, auch über 14 Tage. Es fand also auch über 24 h keine Reduktion des *AlamarBlue* Farbstoffes durch das Gel oder dessen Inhaltsstoffe

Diskussion

statt. Genaue Aufschlüsse darüber, in welcher Tinte die Fibroblasten in Mono-Kultur die qualitativ beste Viabilität hatten, lassen sich nur schwer treffen. Es lässt sich bezüglich der Druckbarkeit von Fibroblasten Mono-Kultur zusammenfassen, dass sowohl in *Gel Ma A* als auch in *Cellink Bioink* das Überleben der Fibroblasten möglich war. Die Handhabung der Tinte war allerdings durch die geringere Temperaturanfälligkeit und die bessere Sichtbarkeit von *Cellink Bioink* etwas einfacher als dies bei *Gel Ma A* der Fall war.

Die Ergebnisse der Versuche mit Fibroblasten in Mono-Kultur deckten sich mit den Versuchen von Rimann et. al. [56]. Auch hier wurden Fibroblasten in Mono-Kultur gedruckt und mittels einem auf Resazurin-basierenden Viabilitätsassay untersucht. Rimann et. al. haben hierbei eine auf einer Polyethylenglykol-Biotinte und einen auf Inkjet-Bioprinting basierende Drucktechnik angewandt. Die Werte der Fibroblasten im Resazurin-basierenden Assay zeigten aber Ähnlichkeiten insbesondere mit den hier gezeigten Ergebnissen in den Versuchen mit *Gel Ma A*. Das Überleben von Zellen in *Cellink Bioink* ist bereits in der Literatur beschrieben [72]. Hier wurden Chondrozyten gedruckt, die den Druck und die Kultivierung innerhalb eines gedruckten Konstrukts für sieben Tage überlebten. Die Biokompatibilität von *Cellink Bioink* konnte also mit den hier vorliegenden Ergebnissen bestätigt und das Überleben von Fibroblasten innerhalb von *Cellink Bioink* bewiesen werden.

6.6. Zellviabilität von adMSC in gedruckter Mono-Kultur

Für die Viabilitätsversuche der adMSC in Mono-Kultur wurden die adMSC kultiviert, mit der Tinte vermischt und gedruckt. Zur Ressourcenschonung wurde eine Zellkonzentration von 10^6 Zellen/ml Biotinte verwendet.

Es zeigte sich, dass die adMSC genau wie die Fibroblasten in Mono-Kultur sowohl in *Cellink Bioink* als auch in *Gel Ma A* über den Zeitraum von 14 Tagen vital sind. Die gedruckten adMSC zeigten in *Cellink Bioink* eine etwas höhere Vitalität. Möglicherweise beruht dieser Effekt darauf, dass der Druck in *Gel Ma A* aufgrund der Thermolabilität der Tinte etwa 10-15 min länger dauert. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse der adMSC in Monokultur ähneln denen von Grune et al. [60]. Auch hier zeigte sich ein Überleben von mesenchymalen Stammzellen in einer auf Alginate ba-

Diskussion

sierenden Biotinte über den Druck hinaus. In einem Laser-assistierten Biodruck konnten Fettgewebstammzellen gedruckt werden, ohne dass sich eine Proliferationseinschränkung der Zellen zeigte. Allerdings wurde in der Arbeit von Grune et al. die Zellproliferation und nicht die Viabilität der Zellen untersucht. Auch in anderen Arbeiten zeigte sich ein Überleben der adMSC über den Zeitraum von 14 Tagen im 3D-gedruckten Konstrukt [91].

Es gilt in Folgearbeiten herauszufinden, ob sich die gedruckten adMSC in den hier verwendeten Konstrukten vergleichbar mit den Konstrukten von Gruene et. al. auch innerhalb der Konstrukte zu Fettgewebszellen differenzieren lassen. Außerdem gilt es eine geeignete Methode zur Färbung der adMSC bzw. Fettgewebszellen innerhalb der gedruckten Konstrukte zu etablieren.

Resümee des 3D-Biodrucks von Mono-Kulturen

Bei der Bestimmung der Viabilität in Mono-Kultur war ein Problem, dass sich die gedruckte Menge Biotinte und damit die Zellzahlen in den einzelnen Wells, schlecht standardisieren ließ. Die Menge der Tinte, die vom Drucker in jedes Well gedruckt wurde, war sehr abhängig vom eingestellten *Pressure* und von der Temperatur der Tinte. Auch entstanden beim Druck in 96-Well-Platten sehr kleine Konstrukte. Es bestand die Gefahr, dass, vor allem für das klare *Gel Ma A*, so versehentlich beim Mediumwechsel die Konstrukte heraus pipettiert wurde. Die Größe der Konstrukte für die Mono-Kultur Versuche mit zwei, vier- und sechslagigen Konstrukten stellte einen Kompromiss dar aus möglichst kleinen Mengen der Biotinte und einem trotzdem reproduzierbaren, standardisierbaren Handling und Druck der Biotinten. Um ein ausgeglichenes Kosten/Nutzen-Verhältnis zu erreichen wurde mit maximal 2×10^6 Zellen/ml Biotinte gedruckt. In Folgearbeiten gilt es zu eruieren, ob mit höheren Zellzahlen ein suffizienterer 3D-Biodruck möglich ist.

6.7. Etablierung der 3D-gedruckten Bi-Kultur aus adMSC und HDMEC

Das langfristige Ziel dieser Arbeit war zu prüfen, inwieweit mittels 3D-Biodrucker Konstrukte mit den beschriebenen Zelltypen entstehen können, die möglicherweise Einzug in die rekonstruktive Chirurgie nach Mammakarzinom-Resektion finden. Vor allem die

Diskussion

Kultivierung und das Überleben der Zellen in den Konstrukten in Bi-Kultur sollte im Vordergrund stehen.

Vor der Umsetzung einer Tri-Kultur aus Endothelzellen, Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen wurde von Christine Lahmers die Bi-Kultur von Fibroblasten mit Endothelzellen in der Arbeitsgruppe etabliert [73]. Hierfür wurden die Endothelzellen vor dem Druck auf *Microcarrier* geladen, um schon im Vorhinein Zell-Zellkontakte der Endothelzellen herzustellen und den Endothelzellen gewissermaßen einen Vorsprung zu geben [92, 93]. Endothelzellen können unter Einfluss der am besten geeigneten Wachstumsfaktoren und den optimierten Umgebungsbedingungen eine vaskuläre Struktur ausbilden [94]. Die auf den *Microcarrier* aufgebrachten Endothelzellen bildeten in weiteren Studien gefäßähnliche Strukturen und könnten so als primäre Gefäßstruktur *in vitro* in Konstrukte eingebracht werden [95]. Das Einsprossen von *in vitro*-Gefäßstrukturen verspricht *in vivo* ein schnelleres Einwachsen und eine bessere Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Konstrukte [39]. Diesem Ansatz wurde in dieser Arbeit nachgegangen, indem das Einbringen von Endothelzellen in Bi-Kultur mit adMSC etabliert werden sollte, um den Aufbau von Gefäßstrukturen anzuregen. Für diese Arbeit wurde mit dem Versuchsaufbau von Lahmers gearbeitet, allerdings mit adMSC anstatt der Fibroblasten als Partner zu den Endothelzellen in Bi-Kultur [73]. Im Vergleich zu der Fibroblasten-HDMEC-Bi-Kultur wurde zum Viabilitätsnachweis eine längere Einwirkzeit des *AlamarBlue*-Assays genutzt, um die Spezifität der Ergebnisse zu erhöhen (vgl. [73]). Ein messbarer Farbumschlag im *AlamarBlue* Assay wurde innerhalb 4 h erkannt, welcher nach 24 h deutlicher war. Eine Hypothese, die Werte nach 4 h in der Fibroblasten-HDMEC-Bi-Kultur zu erklären, könnte sein, dass die Fibroblasten nach dem 3D-Biodruck vitaler sind als die adMSC. Über den Zeitraum von 21 Tagen zeigte sich zu jedem Messzeitpunkt sowohl für die Bi-Kultur von adMSC mit Fibroblasten in *Cellink Bioink* wie auch in *Gel Ma A* eine nachweisbare Vitalität im *AlamarBlue*-Assay. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Eswaramoorthy et al. überein. Auch hier wurde über den Zeitraum von drei Wochen eine Viabilität in einer Bi-Kultur aus mesenchymalen Stammzellen und Endothelzellen nachgewiesen [96]. Eswaramoorthy et al. haben eine auf Alginat und Gelatine basierende Tinte verwendet. Sie haben weiterhin verschiedene Faktoren untersucht, die die Interaktion zwischen den Endothelzellen und den mesenchymalen Stammzellen beeinflussen und die Entwicklung der Nabelschnur-MSCs hin zu Osteodifferenzierung induzieren. Die hier vorgestellten Ergebnisse mittels Viabilitätsassay sind also mit denen

Diskussion

von Eswaramoorthy et al. vergleichbar. Eswaramoorthy et al. haben 4×10^6 /ml Zellen verwendet, in dieser Arbeit wurden maximal 2×10^6 /ml Zellen verwendet. In Folgearbeiten gilt es, die einzelnen Zellen genauer zu untersuchen und zu determinieren, in welcher Form sie sich befinden und ob sich Gefäßstrukturen oder bestimmte Wachstumsfaktoren insbesondere in Hinblick auf die Differenzierung zu Brustfettgewebszellen zeigen.

Zur Überprüfung, welche Zelllinie in den Bi-Kultur-Viabilitätsversuchen für die Umsetzung des *AlamarBlue* verantwortlich war, wurde an Dünnschnitten der Konstrukte, die im *AlamarBlue*-Assay die höchste Viabilität aufwiesen, immunhistochemische Färbungen angefertigt. Hier zeigte sich der Fixier- und Färbeprozess als fehleranfällig. Die Konstrukte waren nach der Fixierung sehr klein und zerfielen zum Teil beim Herausgreifen mit einer Pinzette. Die Konstrukte wurden entwässert und dann in Paraffin eingebettet, was ausgehärtet eine zur *Bioink* sehr ähnliche und zu *Gel Ma A* gleiche Farbe hatte. So war es schwierig, im Paraffinblock die Konstrukte zu finden. Ein standardisiertes Protokoll zum Fixieren, Schneiden und Färben der Bi- und Tri-Kultur-Konstrukte muss in weiteren Arbeiten etabliert werden.

Versuche eine Tri-Kultur im 3D- Druck Verfahren herzustellen und die gedruckten Zellen analog auf ihre Viabilität zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Dies sollte aber in einer Folgearbeit erfolgen. Da die Viabilität der Bi-Kultur HDMEC-adMSC allerdings etwas geringer ausfiel als die der Fibroblasten-HDMEC Bi-Kultur, ist es für eine Tri-Kultur möglicherweise sinnvoll, keine äquivalenten Mengen adMSC und Fibroblasten zu verwenden. Bevor eine Tri-Kultur etabliert werden kann, müssen Färbemethoden zur Definition der einzelnen Zelllinien eruiert werden.

Dreidimensionale Konstrukte für die rekonstruktive Chirurgie benötigen für ein verlässliches Einwachsen eine Prä-Vaskularisierung [97]. In dieser Arbeit wurden Gitter gedruckt, sodass keine Diffusionsstrecken $> 200 \mu\text{m}$ [35] für Sauerstoff und Nährstoffe zu überwinden waren. Insbesondere mit *Gel Ma A* ließen sich die Gitter nicht präzise drucken, da die Tinte nach dem Druck zu einem etwa $1 \times 1 \text{ cm}$ großen Quader verlief. In der Bi-Kultur wurde mit $410 \mu\text{m}$ breiten Spitzen (blau) gedruckt. Die nächstkleinere Spitzenvariante betrug $250 \mu\text{m}$ (rot). Hiermit verstopfte allerdings beim Druck der *Microcarrier* die Spitze. Somit konnte lediglich eine Auflösung von etwa $300\text{-}400 \mu\text{m}$ pro gedruckte Bahn erreicht werden. Hier gilt es also einen Kompromiss zwischen den auf *Microcarrier* geladenen und damit vitaleren Endothelzellen und der genauen

Diskussion

Druckbarkeit mit kleineren Druckerspitzen in weiteren Arbeiten zu etablieren. Es gilt weiterhin Methoden zu verfeinern, die eine Prä-Vaskularisierung der Konstrukte schon *in vitro* möglich machen. Komplexere Strukturen lassen sich mit einer stützenden, zweiten Biotinte drucken [61]. Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte waren klein genug, sodass ohne eine Stützstruktur gedruckt werden konnte. Mit einer zweiten, auswaschbaren Biotinte lassen sich Gefäßstrukturen auch innerhalb von 3D-Konstrukten einbauen. Nach dem Auswaschen der zweiten Biotinte lassen sich die eingedruckten Gefäße dann mit Endothelzellen besiedeln [98, 99]. Durch die verwendete Gitterstruktur konnte auf ein Implementieren von Gefäßstrukturen verzichtet werden, in einem größeren Ansatz sind Gefäßstrukturen aber essenziell. In einem Ansatz von Chhaya et al. wurde die Möglichkeit untersucht, poröse *Scaffolds* zu implantieren, dort Gefäße einsprießen zu lassen und die Zwischenräume nach zwei Wochen mit Fettgewebsaspirat aufzufüllen [62]. Während dies zwar ein vielversprechender Ansatz auf dem Weg zur Prä-Vaskularisierung von Brustgewebsäquivalenten darstellt, kann vor allem bei schlanken Patient*innen zum Teil nicht auf genügend Lipoaspirat zurückgegriffen werden. Auch benötigt dieser Ansatz noch ein künstliches Implantat.

7. Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung des 3D-Biodrucks zur Rekonstruktion von Brustfettgewebe nach Mastektomie. Da der 3D-Biodruck zur Konstruktion von Monokulturen von Fibroblasten und Bi-Kulturen von Fibroblasten mit mesenchymalen Stammzellen etabliert werden konnte und die Konstrukte auch über einen längeren Zeitraum eine Viabilität in zwei verschiedenen Biotinten, *Bioink* und *GelMa A*, zeigten, ist der rekonstruktive Einsatz 3D-gedruckter Brustgewebsäquivalente in Zukunft vorstellbar. Bis zu diesem Ziel gilt es allerdings noch Herausforderungen im *in vitro*-Ansatz zu überwinden. Leider konnten in dieser Arbeit fluoreszenzmikroskopisch in der Tinte keine Unterschiede zwischen *Celltracker red* (638 nm) und *Celltracker green* (488 nm) festgestellt werden. So muss vor der Etablierung der Tri-Kultur eine verlässliche Methode zur Bestimmung der Zelltypen innerhalb der Tri-Kultur etabliert werden. Auch muss eine zuverlässige Methode zum Fixieren, Schneiden und Färben der 3D-gedruckten Konstrukte etabliert und standardisiert werden. Die Differenzierung der adipozytären, mesenchymalen Stammzellen zu Fettgewebszellen sollte weiter untersucht und deren Differenzierung standardisiert werden, nach Möglichkeit sogar innerhalb der gedruckten Konstrukte um eine Vergleichbarkeit mit den Arbeiten von Gruene et al., Eswaramoorthy et al. und Pati et al. herzustellen [60, 61, 96]

Vorgeschlagen wird aufgrund der scheinbar besseren Viabilität der Fibroblasten ein Tri-Kultur-Ansatz in dem Mischverhältnis $1,5 \times 10^6$ Endothelzellen/ml, 1×10^6 adMSC/ml und 5×10^5 Fibroblasten/ml. Hierdurch können einerseits Zellkonzentrationen von 3×10^6 Zellen/ml Tinte erreicht und andererseits die unterschiedlichen Wachstums- und Proliferationseigenschaften der Zellen ausgeglichen werden. Die Tri-Kultur könnte alternativ auch nicht komplett an einem Tag angesetzt, sondern beispielsweise die Bi-Kultur aus Endothelzellen und adMSC zu einem definierten Zeitpunkt mit Fibroblasten beimpft werden. Ein weiterer möglicher Ansatz wäre die dreitägige Differenzierungsinduktion der adMSC zu Fettzellen und dann erst das Ansetzen der Tri-Kultur.

Auf Basis dieser Arbeit kann außerdem vorgeschlagen werden in einem nächsten Schritt die Bi-Kultur aus adMSC und ECFC zu untersuchen. Die verwendeten HDMEC stellen zwar eine standardisierte, einfache Möglichkeit für die Verwendung mikrovasculärer Endothelzellen dar, sind aber für die klinische Anwendung aufgrund der benötigten Vorhaut ungeeignet. ECFC sind Endothelzellen, die aus dem Blut isoliert werden können.

8. Zusammenfassung

Die Therapie des Mammakarzinoms schafft Gewebedefekte in der weiblichen Brust. Zur Rekonstruktion dieser Defekte bieten mittels *Tissue Engineering* erstellte Konstrukte eine spannende Erweiterung der Verfahrenspalette.

In dieser Arbeit wurden die drei Hauptzelltypen menschlichen Fettgewebes, Endothelzellen, Fibroblasten und adipozytäre mesenchymale Stammzellen (adMSC), kultiviert und mittels Extrusion-basiertem 3D-Biodruck mit den kommerziellen Biotinten *Cellink Bioink* und *Gel Ma A* dreidimensional gedruckt. Es wurden jeweils Fibroblasten und adMSC in Monokultur gedruckt. Im Anschluss an die Monokultur wurde eine Bi-Kultur aus adMSC und Endothelzellen gedruckt. Die Endothelzellen wurden im Vorhinein zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten auf Microcarrier geladen und mitsamt der adMSC gedruckt. So kann schon *in vitro* eine Prävasikularisierung stattfinden.

Die Isolation der adMSC aus menschlichem Fettgewebe wurde standardisiert. Ein Protokoll zur Bedienung des kommerziellen *Inkredibile+* 3D-Biodruckers für die verwendeten Zelltypen konnte etabliert werden. Es wurde gezeigt, dass mit den Zelltypen adMSC und Fibroblasten eine Monokultur über 14 Tage im gedruckten Konstrukt vital ist. Auch in der gedruckten Bi-Kultur aus adMSC und Endothelzellen ließ sich über 21 Tage eine Vitalität nachweisen.

In Folgearbeiten sollte dem Ansatz der Ko-Kultur mit Endothelzellen auf Microcarriern nachgegangen werden und insbesondere die Spezifizierung der Zelltypen im Fokus stehen. Weiterhin gilt es Färbemethoden für die gedruckten Konstrukte innerhalb der kommerziellen Biotinten zu etablieren. Mit einer prävasikularisierten Tri-Kultur aus Endothelzellen, Fibroblasten und adMSC wäre ein wichtiger Schritt in Richtung des *in vitro* generierten Brustfettgewebsäquivalents unternommen.

9. Quellen & Literaturverzeichnis

1. Koch-Institut, Z.f.K.Z.i.R., *Datensatz des ZfKD auf Basis der epidemiologischen Landeskrebsregisterdaten, verfügbare Diagnosejahre bis 2015. Version Epi2017_1*. 2019. p. 72-75.
2. Krebsinformationsdienst, <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/brustkrebs/operation.php>. 25.07.2017.
3. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF), *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Kurzversion 4.1 2018*: Germany. p. 47; 134f.
4. Jagsi, R., et al., *Patient-reported Quality of Life and Satisfaction With Cosmetic Outcomes After Breast Conservation and Mastectomy With and Without Reconstruction: Results of a Survey of Breast Cancer Survivors*. *Annals of surgery*, 2015. **261**(6): p. 1198-1206.
5. Araco, A., et al., *Capsular contractures: a systematic review*. *Plast. Reconstr. Surg.*, 2009. **124**(6): p. 1808-19.
6. Langer, R. and J. Vacanti, *Tissue engineering*. *Science*, 1993. **260**(5110): p. 920-926.
7. Janouskova, O., *Synthetic Polymer Scaffolds for Soft Tissue Engineering*. *Physiological research*, 2018. **67**: p. S335-S348.
8. Bosman, F.T. and I. Stamenkovic, *Functional structure and composition of the extracellular matrix*. *The Journal of Pathology*, 2003. **200**(4): p. 423-428.
9. Carletti, E., A. Motta, and C. Migliaresi, *Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture*. *Methods Mol. Biol.*, 2011. **695**: p. 17-39.
10. Edri, R., et al., *Personalized Hydrogels for Engineering Diverse Fully Autologous Tissue Implants*. *Advanced Materials*, 2019. **31**(1): p. 1803895.
11. Ashammakhi, N., et al., *Advancing Frontiers in Bone Bioprinting*. *Adv. Healthc. Mater.*, 2019. **8**(7): p. e1801048.
12. Tarassoli, S.P., et al., *Skin tissue engineering using 3D bioprinting: An evolving research field*. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.*, 2018. **71**(5): p. 615-623.
13. Brantsch, I., *Etablierung der Trikkultivierung primärer Zellen in dreidimensionalen Kollagengelen zur Rekonstruktion weiblichen Brustgewebes 2019*, Johannes Gutenberg Universität Mainz.
14. Jesinger, R.A., *Breast anatomy for the interventionalist*. *Tech. Vasc. Interv. Radiol.*, 2014. **17**(1): p. 3-9.
15. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie, Kapitel Fettgewebe*. Vol. 3. 2009.
16. Chang, H.Y., et al., *Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. **99**(20): p. 12877-12882.
17. Eming, S.A. and J.A. Hubbell, *Extracellular matrix in angiogenesis: dynamic structures with translational potential*. *Experimental Dermatology*, 2011. **20**(7): p. 605-613.
18. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. *Nature Medicine*, 2000. **6**(4): p. 389-395.
19. Patan, S., *Vasculogenesis and angiogenesis*. *Cancer Treat. Res.*, 2004. **117**: p. 3-32.
20. Pozzi, A. and R. Zent, *Regulation of endothelial cell functions by basement membrane- and arachidonic acid-derived products*. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, 2009. **1**(2): p. 254-272.
21. Berthod, F., *Fibroblasts and endothelial cells: The basic angiogenic unit*. 2013, Nova Science Publishers, Inc. . p. 145-157.
22. Elbachiri, M., et al., *[Breast cancer in men: about 40 cases and literature review]*. *Pan. Afr. Med. J.*, 2017. **28**: p. 287.
23. Tan, P.H., et al., *The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast*. *Histopathology*, 2020. **77**(2): p. 181-185.

Quellen & Literaturverzeichnis

24. Wittekind, C., *TNM Klassifikation maligner Tumoren: Korrigierter Nachdruck 2020 mit allen Ergänzungen der UICC aus den Jahren 2017 bis 2019*. Vol. 8. Auflage. 2020: Wiley-VCH.
25. Nahabedian, M.Y. and K. Patel, *Autologous flap breast reconstruction: Surgical algorithm and patient selection*. J. Surg. Oncol., 2016. **113**(8): p. 865-74.
26. Hunter, C., et al., *Superior Gluteal Artery Perforator Flap: The Beauty of the Buttock*. Ann. Plast. Surg., 2016. **76 Suppl 3**: p. S191-5.
27. Kokosis, G., N. Khavanin, and M.Y. Nahabedian, *Latissimus Dorsi Musculocutaneous Flap for Complex Breast Reconstruction: Indications, Outcomes and a Proposed Algorithm*. Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open., 2019. **7**(8): p. e2382.
28. Pérez-Cano, R., et al., *Prospective trial of adipose-derived regenerative cell (ADRC)-enriched fat grafting for partial mastectomy defects: the RESTORE-2 trial*. Eur. J. Surg. Oncol., 2012. **38**(5): p. 382-9.
29. Nahabedian, M., MD. *Implant-based breast reconstruction and augmentation*. 2020 25.07.2020]; Available from: https://www.uptodate.com/contents/implant-based-breast-reconstruction-and-augmentation?search=breast%20reconstruction&topicRef=801&source=see_link.
30. Nichter, L.S., R.A. Hardesty, and G.M. Anigian, *IDEAL IMPLANT Structured Breast Implants: Core Study Results at 6 Years*. Plast. Reconstr. Surg., 2018. **142**(1): p. 66-75.
31. Eriksen, C., et al., *A prospective randomized study comparing two different expander approaches in implant-based breast reconstruction: one stage versus two stages*. Plast. Reconstr. Surg., 2012. **130**(2): p. 254e-264e.
32. Maurice Nahabedian, M.A.G., MD. *Complications of reconstructive and aesthetic breast surgery*. Mar 09, 2020 Mar 09, 2020; Available from: https://www.uptodate.com/contents/complications-of-reconstructive-and-aesthetic-breast-surgery?topicRef=96116&source=see_link#H7527440.
33. Araco, A., et al., *A retrospective analysis of 3,000 primary aesthetic breast augmentations: postoperative complications and associated factors*. Aesthetic Plast. Surg., 2007. **31**(5): p. 532-9.
34. Annamalai, R., D. Armant, and H. Matthew, *A Glycosaminoglycan Based, Modular Tissue Scaffold System for Rapid Assembly of Perfusable, High Cell Density, Engineered Tissues*. PloS one, 2014. **9**: p. e84287.
35. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie, Kapitel Knorpelgewebe* 2009. **3**.
36. Chang, L.R., G. Marston, and A. Martin, *Anatomy, Cartilage*, in *StatPearls*. 2021, StatPearls Publishing, Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
37. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-257.
38. Radisic, M., et al., *Oxygen gradients correlate with cell density and cell viability in engineered cardiac tissue*. Biotechnology and Bioengineering, 2006. **93**(2): p. 332-343.
39. Heller, M., et al., *Tissue engineered pre-vascularized buccal mucosa equivalents utilizing a primary triculture of epithelial cells, endothelial cells and fibroblasts*. Biomaterials, 2016. **77**: p. 207-215.
40. Schöneberg, J., et al., *Engineering biofunctional in vitro vessel models using a multilayer bioprinting technique*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 10430.
41. Kolesky, D.B., et al., *3D Bioprinting of Vascularized, Heterogeneous Cell-Laden Tissue Constructs*. Advanced Materials, 2014. **26**(19): p. 3124-3130.
42. MacNeil, S., *Progress and opportunities for tissue-engineered skin*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 874-880.
43. Hammouche, S., D. Hammouche, and M. McNicholas, *Biodegradable Bone Regeneration Synthetic Scaffolds: in Tissue Engineering*. Current stem cell research & therapy, 2012. **7**: p. 134-42.
44. LaPorta, T.F., et al., *Clinical relevance of scaffolds for cartilage engineering*. Orthop. Clin. North. Am., 2012. **43**(2): p. 245-54, vi.

Quellen & Literaturverzeichnis

45. Cunha, C., S. Panseri, and S. Antonini, *Emerging nanotechnology approaches in tissue engineering for peripheral nerve regeneration*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2011. **7**(1): p. 50-59.
46. Palchesko, R.N., S.D. Carrasquilla, and A.W. Feinberg, *Natural Biomaterials for Corneal Tissue Engineering, Repair, and Regeneration*. *Adv. Healthc. Mater.*, 2018. **7**(16): p. e1701434.
47. Song, H.G., et al., *Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise*. *Cell Stem Cell*, 2018. **22**(3): p. 340-354.
48. Inga Rabe, K.S. *Revolution aus dem Drucker - Wie 3D-Druck die Wirtschaft verändert* 2019 [cited 2019 21.05.2019]; Available from: <https://www.zdf.de/nachrichten/heute/wie-3d-druck-die-wirtschaft-veraendert-100.html>.
49. Bhatia, S. and S. Sharma, *3D-Printed Prosthetics Roll Off the Presses*. *Chemical Engineering Progress*, 2014. **110**: p. 28-33.
50. Gershon, E., *Dr. Mark Michalski is ready to print a 3-D brain (maybe yours)*. 2013.
51. Martelli, N., et al., *Advantages and disadvantages of 3-dimensional printing in surgery: A systematic review*. *Surgery*, 2016. **159**(6): p. 1485-1500.
52. Leberfinger, A.N., et al., *Bioprinting functional tissues*. *Acta. Biomater.*, 2019.
53. Herold, G., *Innere Medizin*. 2019. 648.
54. Noor, N., et al., *3D Printing of Personalized Thick and Perfusable Cardiac Patches and Hearts*. *Advanced Science*, 2019. **0**(0): p. 1900344.
55. Hong, N., et al., *3D bioprinting and its in vivo applications*. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, 2018. **106**(1): p. 444-459.
56. Rimann, M., et al., *Standardized 3D Bioprinting of Soft Tissue Models with Human Primary Cells*. *J. Lab. Autom.*, 2016. **21**(4): p. 496-509.
57. Quílez, C., et al., *Bioprinting for Skin*, in *3D Bioprinting: Principles and Protocols*, J.M. Crook, Editor. 2020, Springer US: New York, NY. p. 217-228.
58. Cleversey, C., M. Robinson, and S.M. Willerth, *3D Printing Breast Tissue Models: A Review of Past Work and Directions for Future Work*. *Micromachines*, 2019. **10**(8): p. 501.
59. Khoo, D., et al., *Nipple Reconstruction: A Regenerative Medicine Approach Using 3D-Printed Tissue Scaffolds*. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2018. **25**(2): p. 126-134.
60. Gruene, M., et al., *Adipogenic differentiation of laser-printed 3D tissue grafts consisting of human adipose-derived stem cells*. *Biofabrication*, 2011. **3**(1): p. 015005.
61. Pati, F., et al., *Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink*. *Nat. Commun.*, 2014. **5**: p. 3935.
62. Chhaya, M.P., et al., *Transformation of Breast Reconstruction via Additive Biomanufacturing*. *Sci. Rep.*, 2016. **6**: p. 28030.
63. Moldovan, N.I., *Three-Dimensional Bioprinting of Anatomically Realistic Tissue Constructs for Disease Modeling and Drug Testing*. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2021. **27**(3): p. 225-231.
64. Brancato, V., et al., *Could 3D models of cancer enhance drug screening?* *Biomaterials*, 2020. **232**: p. 119744.
65. Günter Spur, F.-L.K., *CAD-Technik. Lehr- und Arbeitsbuch für die Rechnerunterstützung in Konstruktion und Arbeitsplanung*. 1984, Hanser, München/Wien. 16.
66. All3DP, B.P. *STL TO G-CODE*. 2020; Available from: <https://all3dp.com/2/stl-to-g-code-how-to-convert-stl-files-to-g-code/>.
67. Moon, S., et al., *Layer by Layer Three-dimensional Tissue Epitaxy by Cell-Laden Hydrogel Droplets*. *Tissue engineering. Part C, Methods*, 2009. **16**: p. 157-66.
68. Yue, K., et al., *Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels*. *Biomaterials*, 2015. **73**: p. 254-271.
69. Snyder, J.E., et al., *Bioprinting cell-laden matrigel for radioprotection study of liver by pro-drug conversion in a dual-tissue microfluidic chip*. *Biofabrication*, 2011. **3**(3): p. 034112.

Quellen & Literaturverzeichnis

70. Cui, X. and T. Boland, *Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology*. *Biomaterials*, 2009. **30**(31): p. 6221-7.
71. Hockaday, L.A., et al., *Rapid 3D printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds*. *Biofabrication*, 2012. **4**(3): p. 035005.
72. Markstedt, K., et al., *3D Bioprinting Human Chondrocytes with Nanocellulose–Alginate Bioink for Cartilage Tissue Engineering Applications*. *Biomacromolecules*, 2015. **16**(5): p. 1489-1496.
73. Lahmers, C., *Die Herstellung von prä-vascularisierten Brustgewebe-Konstrukten mittels 3D-Biodruck*, in *Hochschule Kaiserslautern, University of Applied Sciences, Informatik- und Mikrosystemtechnik Zweibrücken*. 2020.
74. Quirici, N., et al., *Anti-L-NGFR and -CD34 Monoclonal Antibodies Identify Multipotent Mesenchymal Stem Cells in Human Adipose Tissue*. *Stem Cells and Development*, 2009. **19**(6): p. 915-925.
75. *G-Code Commands*. 2020 [cited 2020; Available from: <https://reprap.org/wiki/G-code/de>].
76. Cellink. *How to install and set up HeartWare (Bioprinting Assisting Software) on a Windows PC*. Available from: <https://cellink.freshdesk.com/support/solutions/articles/35000027693-how-to-install-and-set-up-heartware-bioprinting-assisting-software-on-a-windows-pc>.
77. PT, J., *Bioprinting Protocol CELLINK GelMA*. 2019, Cellink
78. Guilbault, G.G., [11] *Fluorometric determination of dehydrogenase activity using resorufin*, in *Methods in Enzymology*. 1975, Academic Press. p. 53-56.
79. O'Brien, J., et al., *Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity*. *European Journal of Biochemistry*, 2000. **267**(17): p. 5421-5426.
80. *Product Information Sheet Alamar Blue Cell Viability Reagent*. 2020.
81. Maurice Nahabedian, M. *Overview of breast reconstruction*. 2020 [cited 2020 08.06.2020]; Available from: <https://www.uptodate.com/contents/overview-of-breast-reconstruction>.
82. *Pubmed Timeline Results per Year*. 2021.
83. Honigmann, P., et al., *Patient-Specific Surgical Implants Made of 3D Printed PEEK: Material, Technology, and Scope of Surgical Application*. *BioMed. Research International*, 2018. **2018**: p. 4520636.
84. JB, *Bioprinting Protocol CELLINK Bioink*. 2019, Cellink.
85. Hinton, T., et al., *Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels*. *Science Advances*, 2015. **1**: p. e1500758-e1500758.
86. Lin, C.-S., et al., *Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells?* *Cytotherapy*, 2012. **14**(10): p. 1159-1163.
87. Kraus, N.A., et al., *Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture*. *Adipocyte*, 2016. **5**(4): p. 351-358.
88. Shi, P., A. Laude, and W.Y. Yeong, *Investigation of cell viability and morphology in 3D bio-printed alginate constructs with tunable stiffness*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2017. **105**(4): p. 1009-1018.
89. Hamid, R., et al., *Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening*. *Toxicol In Vitro*, 2004. **18**(5): p. 703-10.
90. Rampersad, S.N., *Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays*. *Sensors (Basel)*, 2012. **12**(9): p. 12347-60.
91. Pati, F., et al., *Biomimetic 3D tissue printing for soft tissue regeneration*. *Biomaterials*, 2015. **62**: p. 164-175.
92. Luetchford, K.A., J.B. Chaudhuri, and P.A. De Bank, *Silk fibroin/gelatin microcarriers as scaffolds for bone tissue engineering*. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, 2020. **106**: p. 110116.
93. Zhang, S., et al., *Fabrication of viable and functional pre-vascularized modular bone tissues by coculturing MSCs and HUVECs on microcarriers in spinner flasks*. *Biotechnol J.*, 2017. **12**(8).

10. Anhang

94. Carmeliet, P., *Angiogenesis in health and disease*. Nature Medicine, 2003. **9**(6): p. 653-660.
95. Bezenah, J.R., Y.P. Kong, and A.J. Putnam, *Evaluating the potential of endothelial cells derived from human induced pluripotent stem cells to form microvascular networks in 3D cultures*. Sci. Rep., 2018. **8**(1): p. 2671.
96. Eswaramoorthy, S.D., et al., *3D bioprinting of mesenchymal stem cells and endothelial cells in an alginate-gelatin-based bioink*. Journal of 3D Printing in Medicine, 2021. **5**(1): p. 23-36.
97. Tremblay, P.-L., et al., *Inoculation of Tissue-Engineered Capillaries with the Host's Vasculature in a Reconstructed Skin Transplanted on Mice*. American Journal of Transplantation, 2005. **5**(5): p. 1002-1010.
98. Peng, K., et al., *3D Bioprinting of Reinforced Vessels by Dual-Cross-linked Biocompatible Hydrogels*. ACS. Appl. Bio. Mater., 2021. **4**(5): p. 4549-4556.
99. Bertassoni, L.E., et al., *Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs*. Lab. Chip., 2014. **14**(13): p. 2202-11.

10. Anhang

10.1. Werte der Tabellen

Grafik 14 – Fibroblasten in Bioink, MTT.

	1d	3d	6d	10d
0 Zellen/ml	0,15185758	0,1899205	0,11262466	0,12655462
10 ⁶ Zellen/ml	0,33945089	0,15320175	0,46899373	0,18240394
2x10 ⁶ Zellen/ml	0,16333687	0,26469066	0,24334541	0,27912138
Standardfehler	1d	3d	6d	10d
0/ml	0,06885444	0,0147045	0,0475649	0,0298365
10 ⁶ /ml	0,10224263	0,04875662	0,27447237	0,00320874
2x10 ⁶ /ml	0,04087433	0,06336414	0,06966487	0,06166678

Grafik 15 – Fibroblasten in GelMa A über 24 h

	0	1	2	3	4	6
0/ml, kleines Konstrukt	0	0	0,0125399	0,01665611	0,00896053	0,02069876
0/ml, mittleres Konstrukt	0	0,1322674	0,16914871	0,17089114	0,16217637	0,17301857
0/ml, großes Konstrukt	0	0,08457832	0,0853602	0,0800423	0,0653915	0,09714518
10 ⁶ /ml, kleines Konstrukt	0	0,04676553	0,06973713	0,10777932	0,12843183	0,25145108
10 ⁶ /ml, mittleres Konstrukt	0	0,16558367	0,25852499	0,38411881	0,50418415	0,84201792
10 ⁶ /ml, großes Konstrukt	0	0,18002491	0,37190451	0,573304	0,79356262	1,28722021
2x10 ⁶ /ml, kleines Konstrukt	0	0,13033515	0,22988191	0,32700066	0,38915867	0,62168097
2x10 ⁶ /ml, mittleres Konstrukt	0	0,25525193	0,45265665	0,61498134	0,81336583	1,17823983
2x10 ⁶ /ml, großes Konstrukt	0	0,20948463	0,47045491	0,71515001	0,95757171	1,73009809

	8	10	12	14	16	19	24
	0,05343056	0,05612379	0,08488119	0,11469787	0,14239268	0,20524869	0,26082095
	0,2007852	0,22891713	0,27655122	0,31302053	0,37283372	0,43346552	0,52325885

10. Anhang

0,11176546	0,16389968	0,17362496	0,22159088	0,25450123	0,32570598	0,38278557
0,40241883	0,55535645	0,71577689	0,87227705	1,19025179	1,54541028	2,14348248
1,20255241	1,62659711	2,07727018	2,45735874	2,83750512	3,56244851	4,9798302
1,92673537	2,3634075	3,03457977	3,73902051	4,45750508	5,433363	6,67110731
0,89190089	1,09570505	1,38665153	1,6515073	1,93683007	2,3807931	3,17436217
1,73028946	2,19328236	2,68178216	3,2145192	3,80503945	4,61440022	6,22089985
2,53575653	3,29598319	4,01892728	4,83708845	5,70349925	6,97663396	9,01000404

Standardfehler	0	1h	2h	3h	4h	6h
0/ml, 2x2x2	0	0	0,00595502	0,0071832	0,01186307	0,0072115
0/ml, 4x2x2	0	0,01315109	0,02643778	0,02935692	0,01440231	0,01215951
0/ml, 6x2x2	0	0,04999559	0,05349893	0,04471943	0,05506418	0,05756294
10 ⁶ /ml, 2x2x2	0	0,03120719	0,02213222	0,02232784	0,02368127	0,0707876
10 ⁶ /ml, 4x2x2	0	0,07547476	0,08876105	0,13897821	0,20599666	0,34685024
10 ⁶ /ml, 6x2x2	0	0,04889649	0,12928493	0,25860248	0,33303802	0,65773867
2x10 ⁶ /ml, 2x2x2	0	0,09283897	0,0927847	0,08921657	0,1059717	0,10440066
2x10 ⁶ /ml, 4x2x2	0	0,10887358	0,12947358	0,1090802	0,13737422	0,12781606
2x10 ⁶ /ml, 6x2x3	0	0,02029786	0,02884482	0,13678101	0,17833418	0,40517652

8h	10h	12h	14h	16h	19h	24h
0,01383803	0,00914266	0,00944913	0,00953277	0,01272207	0,02190177	0,03054652
0,02376672	0,02859459	0,03315762	0,04128839	0,05582569	0,08799652	0,09149041
0,061461	0,07542773	0,06915332	0,0832474	0,08708499	0,1045263	0,10188374
0,13032888	0,19189905	0,24471791	0,29725361	0,45458248	0,5783621	0,81343795
0,59818413	0,69800995	0,86254941	1,01283234	1,17724724	1,47676927	2,21820341
0,91994078	1,23855962	1,51379422	2,0041915	2,45307838	2,90892489	3,25279462
0,07774898	0,07353115	0,06987899	0,06281755	0,0860423	0,01345817	0,03995412
0,09591849	0,10933693	0,08947964	0,11495528	0,15343295	0,18449559	0,4260586
0,56638553	0,80683011	0,87262426	1,00680619	1,21794957	1,35283387	1,41029913

Grafik 16 – Fibroblasten in Bioink

	1	3	6	10	14
10 ⁶ Zellen/ml Gel in kleinem Konstrukt	2,0522405	3,140653	4,4899025	5,837989	5,9279795
10 ⁶ Zellen/ml Gel in mittelgroßem Konstrukt	2,2436105	3,5602375	5,02551	7,820885	8,885081
10 ⁶ Zellen/ml Gel in großem Konstrukt	3,488604	5,005921	6,9407865	9,429029	10,558196
2x10 ⁶ Zellen/ml Gel in kleinem Konstrukt	6,5067345	9,540386	10,1870675	14,851291	15,880597
2x10 ⁶ Zellen/ml Gel in mittelgroßem Konstrukt	13,3913635	16,5709183	17,19377	19,157545	19,6895792

10. Anhang

2x10 ⁶ Zellen/ml Gel in großem Konstrukt	16,722154	20,172329	20,7284945	22,42005	21,372887
---	-----------	-----------	------------	----------	-----------

Standardfehler					
10 ⁶ /ml, 2x2x2	1,69861413	2,56959258	3,65558568	4,68531281	4,04403218
10 ⁶ /ml, 4x2x2	1,70881863	2,50805614	3,91016296	5,48168444	4,67773582
10 ⁶ /ml, 6x2x2	2,3912498	3,66130712	4,92756836	6,07431823	6,10719784
2x10 ⁶ /ml, 2x2x2	1,77913354	2,46611483	0,81782465	1,0447283	1,86286381
2x10 ⁶ /ml, 4x2x2	4,62299921	2,90871097	1,77718296	2,3110852	2,34332066
2x10 ⁶ /ml, 6x2x2	4,33086944	2,35960447	1,14491357	1,35343336	0,97432718

Grafik 17 Fibroblasten in GelMa A

	1	3	6	10	14
10 ⁶ Zellen/ml Gel in kleinem Konstrukt	1,03100667	2,05396413	2,32181607	4,67415667	7,2095265
10 ⁶ Zellen/ml Gel in mittelgroßem Konstrukt	1,56645267	4,07356533	5,53069533	9,68151933	12,9610405
10 ⁶ Zellen/ml Gel in großem Konstrukt	2,18534667	5,01501933	6,44939667	10,9795493	14,7166718
2x10 ⁶ Zelln/ml Gel in kleinem Konstrukt	1,98319733	2,09491947	5,28829007	7,83867267	12,9340913
2x10 ⁶ Zellen/ml Gel in mittelgroßem Konstrukt	6,084012	9,236878	10,3619887	14,1781967	15,9550013
2x10 ⁶ Zellen/ml Gel in großem Konstrukt	7,12122667	11,132862	11,856634	13,9633687	15,517

Standardfehler					
10 ⁶ /ml, 2x2x2	0,608039	1,51789069	1,34345806	2,78160108	3,76191536
10 ⁶ /ml, 4x2x2	1,04370045	2,15491672	2,28580337	4,02176743	4,32131972
10 ⁶ /ml, 6x2x2	1,19411188	2,88003293	2,41992129	3,65083023	2,66611378
2x10 ⁶ /ml, 2x2x2	0,53918759	0,93274252	3,29495237	2,73151606	4,12679259
2x10 ⁶ /ml, 4x2x2	3,48773954	4,43000339	2,77812066	3,12295375	2,00041484
2x10 ⁶ /ml, 6x2x2	3,95564319	4,39381081	4,22761055	4,02228083	3,20743891

Grafik 18 – adMSC in Bioink

	1	3	6	10	14
10 ⁶ Zellen/ml Gel in kleinem Konstrukt	1,45187533	1,14297733	1,3003765	0,95713444	1,24022178
10 ⁶ Zellen/ml Gel in mittelgroßem Konstrukt	3,66522733	3,15936267	2,65565733	2,825082	3,17203
10 ⁶ Zellen/ml Gel in großem Konstrukt	6,06219167	5,3502395	4,53215383	4,58367533	5,39465667

Standardfehler					
10 ⁶ Zellen/ml Gel in kleinem Konstrukt	0,7143947	0,39338034	0,40856439	0,49107658	0,65716067
10 ⁶ Zellen/ml Gel in mittelgroßem Konstrukt	1,54577148	1,23758605	0,94424799	1,02866561	1,10870025

10. Anhang

10 ⁶ Zellen/ml Gel in großem Konstrukt	2,81076827	1,58349729	1,17001301	1,3593991	1,36287925
---	------------	------------	------------	-----------	------------

Grafik 19 – adMSC in GelMa A

	1	3	6	10	14
10 ⁶ Zellen/ml Gel in kleinem Konstrukt	0,11276067	0,112819	0,092684	0,183008	0,26975533
10 ⁶ Zellen/ml Gel in mittelgroßem Konstrukt	0,853144	0,787574	0,87578867	1,17489467	1,40147333
10 ⁶ Zellen/ml Gel in großem Konstrukt	1,32768533	1,361611	1,26004733	1,65785467	1,98683333

Standardfehler					
10 ⁶ Zellen/ml Gel in kleinem Konstrukt	0,09044024	0,09211633	0,092684	0,1380118	0,15955668
10 ⁶ Zellen/ml Gel in mittelgroßem Konstrukt	0,1084003	0,06743119	0,2718709	0,31413743	0,35371513
10 ⁶ Zellen/ml Gel in großem Konstrukt	0,28277747	0,51778866	0,30468675	0,25533264	0,44075613

Grafik 21 – adMSC + HDMEC in Bioink

	0	5	7	10	14	21
Kokultur	5,64095333	7,38553	7,15625778	6,65019444	5,81401778	3,46324778
Standardfehler	1,87284691	3,43178694	2,79986492	2,76647568	1,51801687	0,78206816

Grafik 22 – adMSC + HDMEC in Gel Ma A

	0	5	7	10	14	21
Kokultur	3,11603889	5,85474444	6,23023667	7,70787222	7,77301111	8,30399889
Standardfehler	0,54271356	2,10265041	2,23773365	3,23824484	3,50734098	3,28491926

10.2. G-Codes

Konstrukte in 96-Well-Platten

kleines Konstrukt	mittleres Konstrukt	großes Konstrukt	
G92 X0 Y0	G92 X0 Y0	G92 X0 Y0	G1 Z1.8
G0 Z15	G0 Z15	G0 Z15	G1 X1
G1 Z0.3 F600	G1 Z0.3 F600	G1 Z0.3 F600	G1 Y1
M760	M760	M760	G1 X-1
G1 X1	G1 X1	G1 X1	G1 Y-1
G1 Y1	G1 Y1	G1 Y1	G1 X1
G1 X-1	G1 X-1	G1 X-1	G1 Y0
G1 Y-1	G1 Y-1	G1 Y-1	M761

10. Anhang

G1 X1	G1 X1	G1 X1	G0 X0 Y0
G1 Y0	G1 Y0	G1 Y0	G0 Z15
G1 Z0.6	G1 Z0.6	G1 Z0.6	G0 X8.99
G1 X1	G1 X1	G1 X1	G92 X0 Y0
G1 Y1	G1 Y1	G1 Y1	G0 Z15
G1 X-1	G1 X-1	G1 X-1	
G1 Y-1	G1 Y-1	G1 Y-1	
G1 X1	G1 X1	G1 X1	
G1 Y0	G1 Y0	G1 Y0	
M761	G1 Z0.9	G1 Z0.9	
G0 X0 Y0	G1 X1	G1 X1	
G0 Z15	G1 Y1	G1 Y1	
	G1 X-1	G1 X-1	
	G1 Y-1	G1 Y-1	
	G1 X1	G1 X1	
	G1 Y0	G1 Y0	
	G1 Z1.2	G1 Z1.2	
	G1 X1	G1 X1	
	G1 Y1	G1 Y1	
	G1 X-1	G1 X-1	
	G1 Y-1	G1 Y-1	
	G1 X1	G1 X1	
	G1 Y0	G1 Y0	
	M761	G1 Z1.5	
	G0 X0 Y0	G1 X1	
	G0 Z15	G1 Y1	
		G1 X-1	
		G1 Y-1	
		G1 X1	
		G1 Y0	

Konstrukte in 24-Well-Platten

G0 Z0.4 F500.0 ; move to first layer	
G0 X-3.5 Y1.5 F500.0 ; move to first line-point	G4 P200
M760	G1 X-2 Y3
G4 P200	M761
G1 X2.5 Y1.5 F600	G4 P200
M761	G0 X-3.5 Y3
G4 P200	M760
G0 X2.5 Y0	G4 P200
M760	G1 X-3.5 Y-3
G4 P200	G1 X2.5 Y-3
G1 X-3.5 Y0	G1 X2.5 Y3
M761	G1 X-3.5 Y3
G4 P200	M761
G0 X-3.5 Y-1.5	
M760	

10. Anhang

G4 P200	
G1 X2.5 Y-1.5	
M761	
G4 P200	
G0 X2.5 Y-3.0	
M760	
G4 P200	
G1 X-3.5 Y-3.0	
G1 X-3.5 Y3.0	
G1 X2.5 Y3.0	
G1 X2.5 Y-3.0	
M761	
G4 P200	
G1 Z0.800 F500.000 ; move to second layer	
G1 X1.0 Y-3.0 F500.000 ; move to first perimeter point	
M760	
G4 P200	
G1 X1 Y3 F450	
M761	
G4 P200	
G0 X-0.5 Y3	
M760	
G4 P200	
G1 X-0.5 Y-3	
M761	
G4 P200	
G0 X-2 Y-3	
M760	

