

Aus dem Zentrum für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

In-vitro Charakterisierung von 3D gedruckten PLA Scheiben und Käfigen

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

Vorgelegt von

Rebekka Carina Gerke
aus Bad Wildungen

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. U. Förstermann

Tag der Promotion: 12.07.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Problemstellung	1
1.2 Ziel der Dissertation	2
2 Stand der Literatur	3
2.1 Konventionelle Knochenersatzverfahren	3
2.2 Scaffolds für den 3D-Druck	5
2.3 Werkstoffe	6
2.4 Integration weiterer Komponenten	6
2.5 Zellen	7
2.6 Wachstumsfaktoren	7
2.7 Reduktion der Komplikationsraten	8
2.8 Vaskularisierung	8
2.9 In-vivo Versuche	9
3 Material und Methoden	10
3.1 Material	10
3.1.1 Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel	10
3.1.2 Geräte	10
3.1.3 Software	11
3.1.4 Werkstoff	11
3.1.5 Zellreihen	11
3.1.6 Chemikalien	12
3.1.7 Organika	12
3.2 Methoden	13
3.2.1 Zellkultur	13
3.2.2 Zellzählung	15
3.2.3 Virustransduktion von Fluoreszenzgenen	15
3.2.4 Fluorescence-activated cell sorting (FACS-Durchflusszytometrie)	15
3.2.5 Erstellen und Vorbereiten der PLA-Modelle	16
3.2.6 Limulus amoebocyte lysate (LAL)-Assay	17
3.2.7 MTT-Assay zur Prüfung der Biokompatibilität	18
3.2.8 Herstellung des bovinen und Rattenschwanz Kollagen-Trägermediums	19

3.2.9 Zellaussaat auf PLA-Modellen	20
3.2.10 Fluoreszenzmikroskopie	22
3.2.11 Zellvitalitätsprüfung mittels Resazurin.....	22
3.2.12 Freisetzungskinetik des Wachstumsfaktors SDF-1.....	23
3.2.13 Zugabe von Wachstumsfaktor SDF-1 im HUVEC Käfig-Modell.....	24
4 Ergebnisse.....	25
4.1 Biokompatibilität und Ausschluss von Endotoxinkontaminationen	25
4.1.1 Biokompatibilitätsprüfung der Modelle	25
4.1.2 Ausschluss von Endotoxinkontaminationen	27
4.2 Erfolgskontrolle nach Virustransduktion von Fluoreszenzgenen	29
4.3 Fluoreszenzmikroskopie	30
4.4 Zellvitalitätsprüfung bei Anzucht auf PLA Modellen	30
4.4.1 PLA-Scheiben ohne Kollagenmantel.....	31
4.4.2 PLA-Scheiben ohne Kollagenmantel mit divergierenden initialen Populationsgrößen	32
4.4.3 PLA-Scheiben mit bovinem und Rattenschwanz Kollagenmantel mit divergierenden initialen Populationsgrößen	35
4.5 Verhalten in der Fluoreszenzmikroskopie	38
4.5.1 PLA-Scheiben mit und ohne Kollagenmantel	38
4.5.1.1 hOB Zellen auf PLA-Scheiben ohne und mit Kollagenmantel.....	39
4.5.1.2 HUVEC Zellen auf PLA-Scheiben ohne und mit Kollagenmantel	41
4.5.1.3 SaOS Zellen auf PLA-Scheiben ohne und mit Kollagenmantel	43
4.5.1.4 NhDF Zellen auf PLA-Scheiben ohne und mit Kollagenmantel	45
4.5.2 Kollagengefüllte PLA-Käfige.....	47
4.5.2.1 hOB in PLA-Käfigen mit bovinem und Rattenschwanz Kollagen	47
4.5.2.2 HUVEC in PLA-Käfigen mit bovinem und Rattenschwanz Kollagen.....	49
4.5.2.3 SaOS in PLA-Käfigen mit bovinem und Rattenschwanz Kollagen.....	51
4.5.2.4 NhDF in PLA-Käfigen mit bovinem und Rattenschwanz Kollagen	53
4.5.3 Cokultur von HUVEC und hOB Zellen	55
4.6 Wachstumsfaktor SDF-1	57
4.6.1 Einfluss von SDF-1 auf Endothelzellen im Käfig-Modell.....	57
4.6.1.1 Käfig-Modell mit SDF-1 im Kollagengel und eingebrachten HUVEC Zellen.....	57
4.6.1.2 Käfig-Modell mit SDF-1 im Kollagengel und aufgebrauchten HUVEC Zellen	58
4.6.2 SDF-1 Freisetzungskinetik aus dem kollagengefüllten Käfig-Modell.....	59
5 Diskussion.....	62
5.1 Biokompatibilität	62
5.2 Ausschluss von Endotoxinkontaminationen	63
5.3 Zellvitalität auf PLA-Modellen	64

5.4 Vergleich des Zellverhaltens auf bovinem und Rattenschwanz Kollagen	64
5.5 Vergleich variierender initialer Populationsgrößen	65
5.6 Virustransduktion von Fluoreszenzgenen	66
5.7 Fluoreszenzmikroskopie	67
5.8 Cokultur verschiedener Zellreihen	68
5.9 Beigabe von Wachstumsfaktor	69
5.10 Fazit und weitere Forschungsanstöße.....	70
6 Zusammenfassung.....	72
7 Literaturverzeichnis.....	73

Abkürzungsverzeichnis

CSE	Control Standard Endotoxin
CXCR-4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
EBM2	Endothelial Basal Medium 2
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FSC	Forward Scatter
hOB	Human Osteoblasts
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
LAL	Limulus ameocyte lysate
LPS	Lipopolysaccharide
LRW	LAL-Reagent-Water
M199	Medium 199
mCherry	monomeric Cherry red fluorescent protein
MEM	Minimum Essential Media
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NhDF	Normal human Dermal Fibroblasts
PBS	Phosphate-buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCL	Polycaprolacton
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml
PGA	Polyglycolid acid
PLA	Polylactic acid
PLGA	Poly lactid-co-glycolid acid

Abkürzungsverzeichnis

SaOS	Sarcoma osteogenic
SDF-1	Stromal cell derived factor 1
SSC	Side Scatter
UPM	Umdrehungen pro Minute
ZDBC	Zinkdibutyldithiocarbamat
ZDEC	Zinkdiethyldithiocarbamat

Weiterhin wurden allgemein gebräuchliche Abkürzungen, SI-Einheiten und Präfixe verwendet.

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PLA- SCHEIBEN UND KÄFIGE [LINKS], SOWIE DER GEDRUCKTEN MODELLE [RECHTS]. PLA-SCHEIBEN [A] UND -KÄFIGE [B] MIT MAßSTAB 5MM	16
ABBILDUNG 2: 3D- DRUCK EINES SCHEIBEN-MODELLS MIT DEM 3D-DRUCKER ULTIMAKER 2+ VOR ABTRENNEN DES PLA-ÜBERSTANDS	20
ABBILDUNG 3: PLA-SCHEIBEN VORBEREITET ZUR ZELLAUSSAAT IN 24-WELL-SUSPENSIONSKULTURPLATTE NACH ABSAUGEN DES SPEZIFISCHEN MEDIUMS.....	20
ABBILDUNG 4: MEDIUM VON DEN AUF PLA-SCHEIBEN AUSGESÄTEN ZELLEN NACH 4 STUNDEN INKUBATION MIT RESAZURIN [BLAU] JE DREIFACH AUF 96-WELL-PLATTEN AUFGETRAGEN. DER FARBUMSCHLAG ZUM METABOLITEN RESORUFIN [ROSA] ZEIGT DAS MAß DER ZELLVITALITÄT AN, WELCHE IN DER FLUORESZENZMESSUNG QUANTIFIZIERT WIRD.....	23
ABBILDUNG 5:AUSWERTUNG DES MTT-ASSAYS – ZELLVITALITÄT IN MEDIUM NACH INKUBATION MIT PLA FÜR 12 STUNDEN [A], 24 STUNDEN [B] UND 48 STUNDEN [C] UND NACH ZUGABE DER ZYTOTOXISCHEN AGENZIEEN ZDEC [ZYTOTOX A] UND ZDBC [ZYTOTOX B] IN REFERENZ ZUR MEDIUMKONTROLLE [%]. BIOKOMPATIBILITÄT WURDE AB 70% UND ZYTOTOXIZITÄT UNTERHALB 40% DEFINIERT	26
ABBILDUNG 6: AUSWERTUNG DES LAL-ASSAYS - ENDOTOXINKONZENTRATIONEN [EU/ML] AUF PLA-SCHEIBEN NACH SPÜLPROTOKOLL FÜR 24 STUNDEN [1+2], NACH SPÜLPROTOKOLL FÜR 48 STUNDEN [3+4], OHNE SPÜLPROTOKOLL [5] UND NACH MEHREREN TAGEN EXPOSITION AUßERHALB DER SCHUTZVERPACKUNG [6]	28
ABBILDUNG 7: DOT-PLOT DARSTELLUNG DER FLUORESZENZ ACTIVATED CELL SORTING (FACS) -MESSUNG AM BEISPIEL DER SAOS ZELLEN NACH WIEDERHOLTER VIRUSTRANSDUKTION MIT EGFP. AUFTRAGUNG DER ZELLPOPULATION NACH SIDE SCATTER [SSC-A] GEGEN FORWARD SCATTER [FSC-A] (LINKS) UND NACH ZELLINDIVIDUELLEM FLUORESZENZINTEGRAL [FL3-A] GEGEN FORWARD SCATTER [FSC-A] (RECHTS) ZUR BESTIMMUNG DES VITALEN, FLUORESZIERENDEN POPULATIONSANTEILS.....	29
ABBILDUNG 8: AUSWERTUNG DER RESAZURIN-FÄRBEVERSUCHE - ZELLVITALITÄT AUF PLA-SCHEIBEN OHNE KOLLAGEN IN DER FRÜHPHASE VON VERSUCHSTAG 2 [D2] MIT ZWISCHENMESSUNG AN VERSUCHSTAG 4 [D4] BIS VERSUCHSTAG 7 [D7] ANHAND DER FLUORESZENZINTENSITÄT.....	31
ABBILDUNG 9: AUSWERTUNG DER RESAZURIN-FÄRBEVERSUCHE - ZELLVITALITÄT AUF PLA-SCHEIBEN OHNE KOLLAGEN IN DER SPÄTPHASE VON VERSUCHSTAG 6 [D6] MIT ZWISCHENMESSUNG AN VERSUCHSTAG 9 [D9] BIS VERSUCHSTAG 13 [D13] ANHAND DER FLUORESZENZINTENSITÄT	32
ABBILDUNG 10: AUSWERTUNG DER RESAZURIN-FÄRBEVERSUCHE - ZELLVITALITÄT AUF PLA-SCHEIBEN OHNE KOLLAGEN MIT EINER START-POPULATIONSGRÖßE VON 50.000 ZELLEN [POPULATIONSGRÖßE 1] VON VERSUCHSTAG 1 [D1] MIT ZWISCHENMESSUNG AN VERSUCHSTAG 4 [D4] BIS VERSUCHSTAG 7 [D7] ANHAND DER FLUORESZENZINTENSITÄT.....	33
ABBILDUNG 11: AUSWERTUNG DER RESAZURIN-FÄRBEVERSUCHE - ZELLVITALITÄT AUF PLA-SCHEIBEN OHNE KOLLAGEN MIT EINER START-POPULATIONSGRÖßE VON 100.000 ZELLEN [POPULATIONSGRÖßE 2] VON VERSUCHSTAG 1 [D1] MIT ZWISCHENMESSUNG AN VERSUCHSTAG 4 [D4] BIS VERSUCHSTAG 7 [D7] ANHAND DER FLUORESZENZINTENSITÄT.....	34
ABBILDUNG 12: AUSWERTUNG DER RESAZURIN-FÄRBEVERSUCHE - ZELLVITALITÄT AUF PLA-SCHEIBEN MIT BOVINEM KOLLAGEN MIT EINER START-POPULATIONSGRÖßE VON 50.000 ZELLEN [POPULATIONSGRÖßE 1] VON VERSUCHSTAG 1 [D1] MIT ZWISCHENMESSUNGEN AN VERSUCHSTAGEN 4 [D4] UND 7 [D7] BIS VERSUCHSTAG 10 [D10] ANHAND DER FLUORESZENZINTENSITÄT.....	35
ABBILDUNG 13: AUSWERTUNG DER RESAZURIN-FÄRBEVERSUCHE - ZELLVITALITÄT AUF PLA-SCHEIBEN MIT BOVINEM KOLLAGEN MIT EINER START-POPULATIONSGRÖßE VON 100.000 ZELLEN [POPULATIONSGRÖßE 2] VON VERSUCHSTAG 1 [D1] MIT ZWISCHENMESSUNGEN AN VERSUCHSTAGEN 4 [D4] UND 7 [D7] BIS VERSUCHSTAG 10 [D10] ANHAND DER FLUORESZENZINTENSITÄT.....	36
ABBILDUNG 14: AUSWERTUNG DER RESAZURIN-FÄRBEVERSUCHE - ZELLVITALITÄT AUF PLA-SCHEIBEN MIT RATTENSCHWANZ KOLLAGEN MIT EINER START-POPULATIONSGRÖßE VON 50.000 ZELLEN [POPULATIONSGRÖßE 1] VON VERSUCHSTAG 1 [D1] MIT ZWISCHENMESSUNGEN AN VERSUCHSTAGEN 4 [D4] UND 7 [D7] BIS VERSUCHSTAG 10 [D10] ANHAND DER FLUORESZENZINTENSITÄT.....	37
ABBILDUNG 15: AUSWERTUNG DER RESAZURIN-FÄRBEVERSUCHE - ZELLVITALITÄT AUF PLA-SCHEIBEN MIT RATTENSCHWANZ KOLLAGEN MIT EINER START-POPULATIONSGRÖßE VON 100.000 ZELLEN [POPULATIONSGRÖßE 2] VON VERSUCHSTAG 1 [D1] MIT ZWISCHENMESSUNGEN AN VERSUCHSTAGEN 4 [D4] UND 7 [D7] BIS VERSUCHSTAG 10 [D10] ANHAND DER FLUORESZENZINTENSITÄT.....	37

ABBILDUNG 16: FLUORESZENZMIKROSKOPIE DER MIT EGFP TRANSDUZIERTEN HOB ZELLEN AUF PLA-SCHEIBEN OHNE KOLLAGEN AN TAG 1, 6 UND 13 DER VERSUCHSREIHE.....	39
ABBILDUNG 17: FLUORESZENZMIKROSKOPIE DER MIT EGFP TRANSDUZIERTEN HOB ZELLEN AUF PLA-SCHEIBEN MIT KOLLAGEN AN TAG 1, 6 UND 13 DER VERSUCHSREIHE.....	40
ABBILDUNG 18: FLUORESZENZMIKROSKOPIE DER MIT MCHERRY TRANSDUZIERTEN HUVEC ZELLEN AUF PLA-SCHEIBEN OHNE KOLLAGEN AN TAG 1, 6 UND 13 DER VERSUCHSREIHE.....	41
ABBILDUNG 19: FLUORESZENZMIKROSKOPIE DER MIT MCHERRY TRANSDUZIERTEN HUVEC ZELLEN AUF PLA-SCHEIBEN MIT KOLLAGEN AN TAG 1, 6 UND 13 DER VERSUCHSREIHE.....	42
ABBILDUNG 20: FLUORESZENZMIKROSKOPIE DER MIT EGFP TRANSDUZIERTEN SAOS ZELLEN AUF PLA-SCHEIBEN OHNE KOLLAGEN AN TAG 1, 6 UND 13 DER VERSUCHSREIHE.....	43
ABBILDUNG 21: FLUORESZENZMIKROSKOPIE DER MIT EGFP TRANSDUZIERTEN SAOS ZELLEN AUF PLA-SCHEIBEN MIT KOLLAGEN AN TAG 1, 6 UND 13 DER VERSUCHSREIHE.....	44
ABBILDUNG 22: FLUORESZENZMIKROSKOPIE DER MIT MCHERRY TRANSDUZIERTEN NHDF ZELLEN AUF PLA-SCHEIBEN OHNE KOLLAGEN AN TAG 1, 6 UND 13 DER VERSUCHSREIHE.....	45
ABBILDUNG 23: FLUORESZENZMIKROSKOPIE DER MIT MCHERRY TRANSDUZIERTEN NHDF ZELLEN AUF PLA-SCHEIBEN MIT KOLLAGEN AN TAG 1, 6 UND 13 DER VERSUCHSREIHE.....	46
ABBILDUNG 24: FLUORESZENZMIKROSKOPIE DER MIT EGFP TRANSDUZIERTEN HOB ZELLEN IM KÄFIG-MODELL MIT BOVINEM KOLLAGEN AN TAG 1, 5, 9 UND 12 DER VERSUCHSREIHE.....	47
ABBILDUNG 25: FLUORESZENZMIKROSKOPIE DER MIT EGFP TRANSDUZIERTEN HOB ZELLEN IM KÄFIG-MODELL MIT RATTENSCHWANZ KOLLAGEN AN TAG 1, 5, 9 UND 12 DER VERSUCHSREIHE.....	48
ABBILDUNG 26: FLUORESZENZMIKROSKOPIE DER MIT MCHERRY TRANSDUZIERTEN HUVEC ZELLEN IM KÄFIG-MODELL MIT BOVINEM KOLLAGEN AN TAG 1, 5, 9 UND 12 DER VERSUCHSREIHE.....	49
ABBILDUNG 27: FLUORESZENZMIKROSKOPIE DER MIT MCHERRY TRANSDUZIERTEN HUVEC ZELLEN IM KÄFIG-MODELL MIT RATTENSCHWANZ KOLLAGEN AN TAG 1, 5, 9 UND 12 DER VERSUCHSREIHE.....	50
ABBILDUNG 28: FLUORESZENZMIKROSKOPIE DER MIT EGFP TRANSDUZIERTEN SAOS ZELLEN IM KÄFIG-MODELL MIT BOVINEM KOLLAGEN AN TAG 1, 5, 9 UND 12 DER VERSUCHSREIHE.....	51
ABBILDUNG 29: FLUORESZENZMIKROSKOPIE DER MIT EGFP TRANSDUZIERTEN SAOS ZELLEN IM KÄFIG-MODELL MIT RATTENSCHWANZ KOLLAGEN AN TAG 1, 5, 9 UND 12 DER VERSUCHSREIHE.....	52
ABBILDUNG 30: FLUORESZENZMIKROSKOPIE DER MIT MCHERRY TRANSDUZIERTEN NHDF ZELLEN IM KÄFIG-MODELL MIT BOVINEM KOLLAGEN AN TAG 1, 5, 9 UND 12 DER VERSUCHSREIHE.....	53
ABBILDUNG 31: FLUORESZENZMIKROSKOPIE DER MIT MCHERRY TRANSDUZIERTEN NHDF ZELLEN IM KÄFIG-MODELL MIT RATTENSCHWANZ KOLLAGEN AN TAG 1, 5, 9 UND 12 DER VERSUCHSREIHE.....	54
ABBILDUNG 32: FLUORESZENZMIKROSKOPIE DER MIT EGFP TRANSDUZIERTEN HOB ZELLEN [GRÜN] UND DER MIT MCHERRY TRANSDUZIERTEN HUVEC ZELLEN [ROT] IN COKULTUR IM KÄFIGMODELL MIT BOVINEM KOLLAGEN AN TAG 1, 5 UND 17 DER VERSUCHSREIHE IN JEWEILS ZWEI VERGRÖßERUNGEN.....	55
ABBILDUNG 33: FLUORESZENZMIKROSKOPIE DER MIT MCHERRY TRANSDUZIERTEN HUVEC ZELLEN IM KÄFIGMODELL NACH BEIGABE VON SDF-1 IN DAS ZELLTRAGENDE BOVINE KOLLAGENGEL AN TAG 1, 5, 9 UND 12 DER VERSUCHSREIHE.....	57
ABBILDUNG 34: FLUORESZENZMIKROSKOPIE DER MIT MCHERRY TRANSDUZIERTEN HUVEC ZELLEN AUFGESETZT AUF DAS KÄFIGMODELL NACH BEIGABE VON SDF-1 IN DAS ZELLFREIE BOVINE KOLLAGENGEL AN TAG 1, 5, 9 UND 12 DER VERSUCHSREIHE.....	58
ABBILDUNG 35: STANDARDKURVE DES FLUORESZENZMARKIERTEN SDF-1 DURCH AUFTRAGEN DER FLUORESZENZ EINER LÖSUNG MIT BEKANNTER SDF-1 KONZENTRATION GEGEN DIE ABSOLUTE ENTHALTENE MENGE SDF-1 [NG] UND RESULTIERENDE LINEARGLEICHUNG ZUR QUANTIFIZIERUNG UNBEKANNTER KONZENTRATIONEN [$y=34.039x+704,51$].....	59
ABBILDUNG 36: SDF-1 FREISETZUNGSKINETIK AUS MIT BOVINEM KOLLAGEN GEFÜLLTEN KÄFIG-MODELLEN NACH ABSOLUTER SDF-1 MENGE [NG] ALS SÄULENDIAGRAMM ENTSPRECHEND DEN MESSZEITPUNKTEN [H].....	60
ABBILDUNG 37: SDF-1 FREISETZUNGSKINETIK AUS MIT BOVINEM KOLLAGEN GEFÜLLTEN KÄFIG-MODELLEN ANHAND DES AUSGESCHÜTTETEN SDF-1 ANTEILS [%] AUF DER LINEAREN ZEITACHSE [H].....	61

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ZUSAMMENSETZUNG DER KOLLAGENGELE AUF BASIS VON RATTENSCHWANZ UND BOVINEM

KOLLAGEN [μ L]..... 19

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

In der Unfallchirurgie und Traumatologie besteht ein deutlicher Bedarf an Knochenersatzprodukten. So stellen vor allem Trümmerfrakturen mit ausgedehntem Trümmerfeld und resultierendem Substanzverlust von vitalem ossärem Gewebe die rekonstruktive Chirurgie vor Herausforderungen (Karalashvili, et al., 2018). Ebenso kommt es bei muskuloskeletalen Malignomen vor allem im Bereich der langen Röhrenknochen zu Stabilitäts- und Kontinuitätsproblemen nach der operativen Versorgung (Zheng, et al., 2019). Gleichsam können ähnliche Defekte durch ossäre Infektionen auftreten, welche häufig die Resektion des betroffenen Areals notwendig machen (Hartemann-Heurtier & Senneville, 2008). Es wird somit eine vielseitig einsetzbare Möglichkeit zum Knochenersatz benötigt.

Heutige verbreitete Verfahren zum Knochenersatz sind häufig auf kurze Defektstrecken limitiert, weisen hohe Revisionsraten auf oder basieren auf überaus langwierigen, und damit komplikationsanfälligen, Behandlungsverfahren. Beispiele hierfür sind Knochenzement (Nusselt, 2014), sowie aufgereinigte Knochenblöcke oder Chips. Speziell zur Versorgung von langstreckigen Defekten stehen als Goldstandard meist nur autologe Transplantationen oder Verfahren des Segmenttransports zur Wahl (Migliorini, et al., 2021), welche nicht für alle Patientengruppen geeignet sind.

Die einmalige operative Versorgung ist zudem häufig nicht ausreichend und trotz Revisionsoperationen kann es zur Entwicklung von Pseudarthrosen kommen. Bei ausbleibender stabiler Kallusbildung müssen nicht selten interne Schienungen in Form von Platten oder Marknägeln eingebracht werden. Diese können zu weiteren Beschwerden führen und sind mit einem erhöhten Infektionsrisiko belegt (Renz, 2017). Bei infektiöser oder tumoröser Genese des Substanzdefekts bleibt teils nur die Amputation, da die Defektstrecke nicht stabil überbrückt werden kann (Nadorf, et al., 2017). Der Segmenttransport ist dagegen ein langwieriges Verfahren, das nicht nur eine hohe Compliance des Patienten verlangt, sondern auch Monate dauern kann, in denen die betroffene Extremität mittels Fixateur extern stabilisiert werden muss (Abula, et al., 2020).

Ein zentrales Thema in der rekonstruktiven Therapie ausgedehnter Knochendefekte ist die Nährstoffversorgung im Bereich des Ersatzmaterials, welche für die Ossifikation und Integration unabdingbar ist (Yu, et al., 2009). Eine Vaskularisierung des Knochenersatzproduktes ist damit essenziell, um die komplikationslose Einheilung des Materials zu gewährleisten. Andernfalls kann es zur Bildung von Gewebnekrosen im

Übergangsbereich von vitalem Knochengewebe und Rekonstruktionsmaterial kommen (Stürmer, 1996). Diese resultieren in einer Instabilität, welche Revisionsverfahren notwendig machen und den Heilungsverlauf um Monate verzögern kann (Richter, et al., 2000).

Gleichzeitig kann die Funktionalität der Extremität gefährdet werden. Alle diese Faktoren können eine Amputation schließlich unumgänglich machen (Westberry, et al., 2018).

In den letzten Jahren seit der Entwicklung des 3D-Drucks hat dieser zunehmend das Interesse der medizinischen Forschung in vielseitigen Anwendungen geweckt. Von exakten anatomischen Modellen des einzelnen Patienten zur OP-Planung und Vorbereitung bis hin zu Überlegungen vollständiger, funktionsfähiger Organnachbildungen für Organersatzverfahren gibt es zahlreiche Forschungsprojekte (Jafari, 2017). Aus diesem Blickwinkel liegt der Nutzen dieser Technik zur Lösung des beschriebenen Problems nahe.

1.2 Ziel der Dissertation

Die angestrebte Dissertation widmet sich der Praktikabilität eines 3D-Druck gestützten Verfahrens zum Knochenersatz ausgedehnter Defekte. Im Fokus wird hierbei ausschließlich die Grundlagenforschung im in-vitro Bereich stehen. Es soll untersucht werden, ob die Anzucht von vitalem Knochenersatzgewebe im 3D gedruckten Polylactid acid (PLA) Gerüst möglich und erfolgversprechend für künftige Knochenersatzverfahren ist. Als wichtigste Aspekte werden hier die Viabilität von ossären und vaskulären Zellreihen im PLA Gerüst sowie ihre Proliferation gewertet. Optimierende Faktoren zur Verbesserung des Zellverhaltens bezüglich des Mediums und der 3D Strukturgebung sowie mögliche kontraproduktive oder limitierende Faktoren sollen ebenfalls untersucht werden.

Zunächst soll daher die Biokompatibilität des gewählten Werkstoffs und die Effektivität der Sterilisation des Materials geprüft werden. Somit soll die Sicherheit des späteren Produkts für den Patienten gewährleistet werden. Weiterhin soll die Konduktivität von Kollagenmatrix als Substrat der Zellkultur im Modell überprüft werden. Das Modell soll mit verschiedenen Zellen und dann zusätzlichem Wachstumsfaktor beladen werden, um die Viabilität des Knochenersatzprodukts zu optimieren. Abschließend soll in den Beobachtungen zentral ein mögliches Potential der Vaskularisierung analysiert werden.

2 Stand der Literatur

Das Konzept zu dieser Arbeit wurde von Februar bis März des Jahres 2017 erstellt. Da es sich bei der Thematik der Knochenersatzverfahren um ein intensiv erforschtes Gebiet handelt, hat sich der Wissensstand und die Zahl der bezugnehmenden Arbeiten seit Beginn des Projekts bereits deutlich erweitert, wenn nicht sogar im Fall des Untergebiets des 3D-Drucks vervielfältigt. Um dieser sprunghaften Entwicklung eines jungen, aber auch klinisch hoch relevanten Forschungsgebiets gerecht zu werden, wurden hier die bereits existierenden, sowie die später entstandenen Forschungsarbeiten dargelegt. Es wurde so Bezug auf die vorbestehende Literatur genommen, sowie der Fülle an parallel veröffentlichten Forschungsergebnissen Rechenschaft gezollt.

2.1 Konventionelle Knochenersatzverfahren

Vor der Konzeptionalisierung dieser Arbeit gab es bereits multiple Ansätze im Bereich der Knochenersatztherapie. Als Goldstandard galt und gilt bis heute die autologe Knochentransplantation (García-Gareta, et al., 2015), also die Entnahme von Knochenanteilen des Patienten selbst, zum Beispiel aus dem Bereich des Calcaneus (Miller & Chiodo, 2016), der Fibula (Basarir, et al., 2005) oder des Beckenkamms (Myeroff & Archdeacon, 2011). Hierbei konnten mit aus dem Beckenkamm gewonnenen Knochenkeilen vor allem kleinere Defekte überbrückt oder unterfüttert werden. So wurde dieses Verfahren beispielsweise im Fall von subchondralen Tibiadefekten im Bereich des Kniegelenks angewandt, wie sie vor allem nach axialen Impaktionstraumata auftraten (Zhu, et al., 2014). Hier kam es teils zu postoperativem Schmerzempfinden im Bereich der Entnahmestelle. Dies konnte in einigen Fällen für einen Zeitraum von bis zu 12 Monaten beobachtet werden (Goff, et al., 2013).

Die Entnahme von Anteilen der Fibula war in erster Linie bei langstreckigen Defekten mit biomechanischer Relevanz notwendig (Lawal, et al., 2011). Durch dieses Verfahren konnte oft eine gute Knochenheilungstendenz erreicht werden, da es sich um körpereigenes vorformiertes Knochenmaterial handelte. Gleichsam wurde für die Durchführung autogener Transplantationen aber ein weiteres Operationsgebiet geschaffen, welches im weiteren Verlauf ebenso zu komplikativen Verläufen wie Wundinfektionen, Frakturen im primären Defektbereich (Yang, et al., 2010) oder chronischem Schmerzsyndrom führen konnte (Parikh, 2002). Ebenso war die Möglichkeit zu dieser Therapie begrenzt durch das zur Verfügung stehende Material. Weiterhin bestand bei Krankheitsbefall der Entnahmestelle

durch mögliche Übertragungen zum Implantationsort das Risiko von Komplikationen im Heilungsverlauf bis hin zum Misserfolg der Therapie (Oryan, et al., 2014). Ebenso war vor allem in Fällen von polytraumatisierten Patienten, welche häufig multiple Verletzungen im Bereich der Extremitäten davontrugen (Banerjee, et al., 2013) oder ausgedehnten einzelnen Defektarealen nach multipler operativer Intervention, oft kein ausreichendes Material zur Transplantation vorhanden (Montgomery & Moed, 1989).

In diesen Fällen wurde auf andere Verfahren der Knochenersatztherapie zurückgegriffen. Zu diesen gehörten allogene sowie xenogene Knochenersatzstoffe. Diese Verfahren brachten ihre eigenen Problematiken mit sich. Im Fall von allogenen Knochenmaterialien war vor allem von aufgereinigter Knochensubstanz von verstorbenen Organspendern zu sprechen (Kübler, et al., 1998). Diese standen in Form von Blöcken oder Chips zur Verfügung und wurden vor allem im Bereich kleinerer Defekte als Füllmaterial eingesetzt (Contar, et al., 2009). Ebenso konnten sie bei bestehenden Pseudarthrosen nach operativem Anfrischen der Defektstelle (Nevins, et al., 2014) oder bei zystischen Defekten im Gelenkbereich als komprimiertes Substrat eingebracht werden (Oakes & Cabanela, 2006). Für eine Versorgung langstreckiger Defekte zeigten sich diese Materialien aufgrund fehlender mechanischer Stabilität jedoch nicht geeignet. Die Entnahme von größeren Knochenanteilen kompatibler Spender wurde untersucht und erbrachte gute Ergebnisse (Chimutengwende-Gordon, et al., 2017), die Nutzung von allogenem ossärem Material bildete allerdings ein tendenziell kostenaufwendiges Verfahren ab (Leung, et al., 2010). Im Falle der xenogenen, also vom Tier stammenden, Knochenersatzstoffe wurde vor allem Material von Schweinen, Rindern und Pferden herangezogen (Hetherington, et al., 2005). Diese mussten vor Einsatz ebenso Aufreinigungsprozesse durchlaufen, um eine mögliche Krankheitsübertragung oder immunologische Abstoßung auszuschließen (Long, et al., 2012). Dennoch bestand das Risiko von Abstoßungsreaktionen, welche zu einer Non-Union des Übergangs vom Transplantat zur Defektgrenze und dem Versagen der Therapie führen konnten (Scalea, et al., 2012).

Weiterhin wurden Verfahren zum Segmenttransport entwickelt, welche auf einer externen Schienung der betroffenen Extremität beruhten, während ein Segment des diaphysären Röhrenknochens über Zeiträume mehrerer Wochen bis Monate in Millimeterschritten geführt wurde, bis es zum Kontakt mit der entgegenliegenden Defektstelle kam (Watson, 2006). Diese Verfahren erbrachten mitunter sehr gute Ergebnisse, da auf eine Einbringung von körperfremdem Knochenersatzmaterial weitestgehend verzichtet wurde. Dennoch basierten sie auf einer überdurchschnittlichen Compliance der Patienten bei häufig notwendiger langwieriger Entlastung einer Extremität, Schmerzsymptomatik, sowie außerordentlich langem Heilungsverlauf und erforderten multiple operative Eingriffe (DeCoster, et al., 2004).

2.2 Scaffolds für den 3D-Druck

Schließlich rückte der in den 1980er Jahren entwickelte 3D-Druck in den Fokus der medizinischen Forschung. Die Vorteile einer Technik, welche patienten- und defektspezifisch angepasst werden konnte, war offenkundig. Auf der Suche nach einem kostengünstigen, weithin verfügbaren Knochenersatzprodukt mit guten biomechanischen Eigenschaften und hoher immunologischer Verträglichkeit wurden zunächst diverse künstliche Produkte erforscht. Zu diesen gehörten unter anderen solche auf Basis von Biokeramik, Glas und Glas-Keramika, welche jedoch eine schlechtere Knochengewebebildung und fehlende Integration am Knochen-Implantat Übergang im Vergleich zum Goldstandard der autologen Transplantation zeigten (Sarkar & Lee, 2015). Es zeigte sich, dass resorbierbare Materialien die Knochenheilungstendenz positiv beeinflussten. Somit wurde der Forschungsfokus auf bioaktive Substrate gelegt. Als Träger dieser wurden bei langstreckigen non-union Defekten Gerüststrukturen eingesetzt. Hier zeigten sich Herausforderungen vor allem in den Bereichen der mechanischen Tragkraft und der fehlenden Vaskularisierung, welche die Osteointegration der Implantate erschwerte (Liu, et al., 2013).

Der 3D-Druck von Knochenersatzpräparaten hatte vor allem aufgrund der hohen Versatilität und gleichzeitigen Kosteneffizienz ein starkes Attraktivitätspotential für die Therapie langstreckiger ossärer Defekte (Fairag, et al., 2019). Gleichzeitig waren Anfertigungen direkt im behandelnden therapeutischen Zentrum vorstellbar, was die Zulieferungs- und Aufbereitungszeit wesentlich reduzieren könnte (Tellisi, et al., 2018). Es wurden verschiedene Verfahren des additiven und subtraktiven 3D-Drucks erforscht. Zu diesen gehörten die Stereolithografie, selektives Lasersintering, Schmelzschichtung und der Tintenstrahldruck (Cheng, et al., 2021). Es wurde zudem ein zusätzlicher Fokus auf Materialien mit osteogenen Mikro- und Nanostrukturen sowie zellbasierte Produkte gelegt, um das Einwandern von Knochengewebe und schließlich eine Ossifikation des Knochenersatzprodukts zu unterstützen. Biologisch abbaubare Materialien erwiesen sich hierzu als wesentlich vorteilhafter als nicht biologisch abbaubare Varianten (Wei, et al., 2020). Porenstrukturen erwiesen sich weiterhin als wichtiger Schlüssel zur Ossifikation, wie erneut im Rattenmodell dargestellt werden konnte (Korn, et al., 2020).

2.3 Werkstoffe

Zum Zeitpunkt der Planung dieser Arbeit waren die häufigsten verwendeten Werkstoffe zur Erstellung eines dreidimensionalen Gerüsts im Bereich des 3D-Drucks zur Knochenersatztherapie die Biopolymere Polylactid acid (PLA), Polyglycolid acid (PGA), Polylactid-co-glycolid acid (PLGA) und Polycaprolacton (PCL), deren Druck sich vor allem in stark porösen und vernetzten Strukturen als essenziell für die Zelladhäsion und Proliferation herausstellte (Okamoto & John, 2013). In diesem Kontext wurde auch eine Plasmamodifikation von PLA nach dem 3D-Druck für eine bessere Nano-Strukturgebung untersucht. Diese ging mit einem besserem Kulturverhalten von Osteoblasten und mesenchymalen Stammzellen einher und verdeutlichte somit erneut die Relevanz von adhäsionsfördernden Nanostrukturen (Wang, et al., 2016). Biopolymerverbindungen boten weiterhin den Vorteil einer hohen Biokompatibilität mit einer teils vollständigen Resorption über die Zeit und Ersatz durch körpereigenes ossäres Material (Bertoldi, et al., 2008). Es entfiel jedoch der Nachteil einer möglichen Übertragung von Pathologien, wie sie bei allogener aber auch autologer Knochen transplantation auftreten konnte.

2.4 Integration weiterer Komponenten

Man bediente sich einer Vielzahl von weiteren Komponenten, um eine verbesserte Integration des Fremdmaterials vor allen an den Kontaktstellen zu den proximalen und distalen Defektenden herbeizuführen (Sarkar & Lee, 2015). Hierzu wurden organische und anorganische Komponenten miteinander kombiniert, um so der gesunden Knochenstruktur möglichst nahe zu kommen (Liu, et al., 2016). Bezüglich der anorganischen Verbindungen wurde den Hydrogelen beispielsweise Hydroxylapatit beigefügt, um so zusätzlich die mechanischen Eigenschaften des Knochenersatzes zu verbessern (Swetha, et al., 2010).

Als weiterer Ansatz zur Verbesserung der verfügbaren Knochenersatzprodukte wurden Wirkstoff enthaltende Materialien für den Druck verwendet. Dies sollte eine lokalisierte Freisetzung dieser Wirkstoffe ermöglichen, welche Infektionen vorbeugen oder die Knochenheilung verbessern sollten. Ebenso wurde die Möglichkeit einer patientenspezifischen Anpassung in Betracht gezogen (Domsta & Seidlitz, 2021).

So wurden Versuche mit Deferoxamin, einem Chelator mit hoher Affinität zu Eisen(III)-Ionen, unternommen, in denen Deferoxamin in 3D gedruckten Gerüstmodellen immobilisiert wurde, so dass es zu einer kontrollierten lokalen Ausschüttung des Medikaments kam. Diese Studie erbrachte Hinweise auf eine verbesserte Vaskularisierung und Ossifikation des

Knochenersatzmaterials. Im Rattenmodell zur Darstellung großer Defekte wurde eine verstärkte Gefäßeinwanderung beobachtet (Yan, et al., 2019). Ebenso wurden Versuche mit Gerüsten, beladen mit Hydroxylapatit mit einer Mikroporosität von 15%, vorgenommen, welche sich im Tiermodell positiv auf den Prozess der Osteogenese auswirkten (Zheng, et al., 2021).

2.5 Zellen

Weiterhin wurden Versuche durchgeführt, die auf dem Einbringen von Zellen in die 3D-Modelle basierten. Beispielsweise wurden erfolversprechende Versuche mit integriertem Zelldruck von Prä-Osteoblasten in Kollagengel mit einem Biokeramik-Gerüst unternommen (Raja & Yun, 2016).

Die 3D gedruckten Gerüstkomponenten konnten als Träger für biologisch aktive osteoinduktive Materialien genutzt werden, so wurden Versuche mit verschiedenen Polymer Hydrogelen aus Chitosan, Hyaluron, Alginat oder Heparin unternommen, welche zusätzlich als Träger für bioaktive Faktoren zur Geweberegeneration dienen konnten (Nguyen & Alsberg, 2014). Die Hydrogele zeigten dabei eine hohe Biokompatibilität mit geringen Raten an Entzündungsreaktionen oder Gewebeschäden. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass das Einbringen von bioaktiven Molekülen oder Zellen in die Gele die Formation von Knochengewebe zusätzlich begünstigte (Park, 2011).

Vor allem die Nutzung von Kollagen als künstliche extrazelluläre Matrix zeigte gute Ergebnisse und wurde intensiviert erforscht (Ferreira, et al., 2012). So zeigte sich, dass die Festigkeit und Viskoelastizität der Implantate durch Kollagen zum Beispiel kombiniert mit Gerüsten aus bioaktiven Ceramica, welche die mechanische Tragkraft verbessern sollten, wesentlich gesteigert werden konnten (Kuttappan, et al., 2016).

2.6 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren in Kombination mit Stammzellen wurde im weiteren Verlauf der Forschung ein besonderes Augenmerk beigemessen (Lee, et al., 2021). Eine Möglichkeit zur Anwendung kombinierter Wachstumsfaktoren bot wachstumsfaktorreiches Plasma, welches sich klinisch vor allem im Bereich der Zahnmedizin hemmend auf Schmerz-, Schwellungs- und Entzündungsreaktionen auswirkte, sowie die Knochen- und Weichgewebsheilung akzelerierte (Solakoglu, et al., 2020). Insgesamt wurde aufgrund der Vielzahl der am

Knochenheilungsprozess beteiligten Wachstumsfaktoren und Zytokine die Theorie aufgestellt, dass eine kombinierte Anwendung der beteiligten Faktoren zu besseren Ergebnissen als die Monotherapie führen würde (Kempen, et al., 2010). In diesem Kontext wurden diverse Kombinationsmöglichkeiten erforscht, eine optimale Komposition konnte bisher jedoch nicht identifiziert werden (Nauth, et al., 2011). Aufgrund der begrenzten Halbwertszeit von Wachstumsfaktoren wurden auch Versuche im Rahmen einer Kombination von 3D-Druck und Gentherapie unternommen. In diesen wurde den Knochenersatzmodellen statt aktiven Wachstumsfaktoren die kodierende Gensequenz für einen endothelialen Wachstumsfaktor in Form von DNA-Plasmiden zugefügt (Bozo, et al., 2020). Der Einsatz von Wachstumsfaktoren, wenn auch in der Idee vielversprechend, wurde bisher durch die geringe Kosteneffizienz und Bedenken bezüglich der Patientensicherheit limitiert. Diese Problematiken resultierten maßgeblich aus den unphysiologisch großen Substanzmengen, welche in Ermangelung optimierter Träger- und Zuführungssysteme notwendig wurden (Martino, et al., 2015).

2.7 Reduktion der Komplikationsraten

Bezüglich der Prävention einer möglichen Wund- und Materialinfektion nach Knochenersatztherapie, welche durch die notwendige poröse Struktur der 3D gedruckten Knochenersatzmaterialien begünstigt wurden, wurde weitere Forschung unternommen. Hier kam ein Gentamycin-beladener Materialüberzug zum Einsatz, welcher sich in vitro wirksam gegen sowohl sessile als auch planktonische Bakterien erwies (Han, et al., 2017).

Auf dem Themengebiet der Defektüberbrückung nach Tumorchirurgie wurden ebenfalls Schritte nach vorne gemacht. Für die postoperative Nachbehandlung von Osteosarkomen, speziell auch bei nicht sicher tumorfreiem Resektionsrand, wurde die Durchführbarkeit einer lokalisierten Chemotherapie im Modell geprüft. Zur Tumorzellsuppression wurden Knochenersatzmaterial die Soja-Isoflavone Genistein, Daidzein und Glycitein beigefügt. Diese erwiesen sich als wirksam bezüglich der lokalen Chemoprävention und Immunmodulation (Sarkar & Bose, 2020).

2.8 Vaskularisierung

Es verblieb die zentrale Problemstellung der Vaskularisierung der 3D gedruckten Knochenersatzprodukte. Die Versorgung der integrierten Zellen sowie des idealerweise einwandernden ossären Gewebes konnte im Fall langstreckiger Defekte nicht mehr durch

Diffusion gewährleistet werden. Hierzu gab es erste Studien, die dieses Problem durch eine Integration von Mikrokanälen im Gerüst zu umgehen versuchten (Kang, et al., 2016).

Zur Optimierung der zur Verfügung stehenden Modellverfahren wurden im Verlauf verschiedene Ansätze geprüft. Hierzu gehörten unter anderen das Design von komplexen geometrischen Gerüststrukturen sowie die Beigabe von Eisen und Silizium Ionen, wobei Eisen die Ossifikation und Silizium die Vaskularisierung verbessern sollte (Bose, et al., 2018). Die Nachempfindung biologischer Eigenschaften stellte insgesamt eine der größten Herausforderungen der Forschung dar. So wurde die Frage nach einer möglichen Neovaskularisierung und somit Versorgung des bioaktiven Knochenersatzes zu einem der zentralen Punkte in der Wahl der 3D-Druck-Technik und des Materials (Genova, et al., 2020). Dies geschah vor allem, da eruiert werden konnte, dass die Gewebeversorgung durch Diffusion nur über eine Strecke von 100 bis maximal 200µm möglich war (Shahabipour, et al., 2020).

2.9 In-vivo Versuche

Auf dieser Arbeit aufbauend wurde ein Mausmodell erstellt, um das in-vivo Verhalten des entwickelten Knochenersatzmodells abzubilden. Hierzu wurden Kalotten-Defekte durch mit Kollagen und osteogenen, sowie endothelialen Zellen gefüllten PLA-Käfigen gedeckt. Dies erfolgte sowohl in Mono- als auch in Kokultur. Vor allem die Versuche mit endothelialen Zellen zeigten vielversprechende Ergebnisse, was die Relevanz der Angiogenese unterstrich (Hertweck, et al., 2018).

Weiterhin wurden zellfreie, mit Kollagen und SDF-1 gefüllte PLA-Implantate im Rattenmodell in Femur-Defekte implantiert. In dieser Versuchsreihe wurde zudem die biomechanische Stabilität der Käfig-Modelle erwiesen (Lauer, et al., 2020).

Auch einige andere im Kleintiermodell durchgeführten Studien zeigten gute Ergebnisse, dennoch zeigten sich bei Umsetzungsversuchen auf größere Spezies und der einhergehenden Notwendigkeit zur Überbrückung längerer Defektstrecken erneut die bekannten Defizite bezüglich der vaskulären Versorgung. Die dieser Arbeit angeschlossenen Untersuchung des vorgeschlagenen Knochenersatzmodells widmeten sich dieser und anderen Thematiken und untersuchte die Performance der hier in-vitro vorgestellten Modelle (Söhling, et al., 2020).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel

24-Well-Suspensionskulturplatten, Sarstedt AG & Co. KG

24-Well-TC-Platten, Sarstedt AG & Co. KG

96-Well-TC-Platten, Sarstedt AG & Co. KG

96-Well-Zellkulturplatten, Sarstedt AG & Co. KG

Cell Counting Slides, Logos Biosystems

Einmalskalpelle, Fisher Scientific

Falcon Röhrchen 40ml, Greiner Bio-One GmbH

Latex-Handschuhe, VWR International, LLC

Mehrfachpipette, Eppendorf Corporate

Pipetten 10ml, Corning, Inc.

Pipetten 25ml, Greiner Bio-One GmbH

Pipetten 5ml, Corning, Inc.

Pipettierhilfen, Eppendorf Corporate

Pipettierspitzen, Eppendorf Corporate

T25-Zellkulturflaschen, Greiner Bio-One GmbH

T75-Zellkulturflaschen, Greiner Bio-One GmbH

3.1.2 Geräte

3D-Drucker Ultimaker 2+ mit 0,25mm Düse, Ultimaker BV

Brutschrank Hera cell 240 (37°C, 5% CO₂-Konzentration), Thermo Electron Corporation

EVOS Fluoreszenzmikroskop, Thermo Fisher

Gefrierschrank (-20°C), Liebherr-Hausgeräte GmbH

Kühlschrank (4°C), Liebherr-Hausgeräte GmbH

Luna Automated Cell Counter, Logos Biosystems

Multiwell-Spectrophotometer GlomaxMulti+ Detectionssystem, Promega Corp.

Sterilbank, Thermo Fisher Scientific

Stickstofftank Arpege 110, Cryopal

Vortexer, VWR International, LLC

Wärmeplatte, Medax Nagel GmbH

Zentrifuge Centrifuge 5804 R, Eppendorf Corporate

3.1.3 Software

Autodesk Inventor 2013, Autodesk Inc.

3.1.4 Werkstoff

Polylactic acid (PLA), Ultimaker BV

3.1.5 Zellreihen

Human Osteoblasts (hOB) - primäre humane Osteoblasten

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) – humane umbilikalvenöse Endothelzellen

L929 – murine Fibroblasten

Normal human Dermal Fibroblasts (NhDF) - humane Hautfibroblasten

Sarcoma osteogenic (SaOS) - osteoblastenähnliche mesenchymale Sarkomzellen

3.1.6 Chemikalien

Aqua ad iniectabilia (H₂O), Fisher Scientific

Fluorometric Cell Viability Kit I, Resazurin, PromoCell GmbH

Isopropanol (Propan-2-ol) 70%, Honeywell International Inc.

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃), Fisher Scientific

Natriumhydroxid (NaOH), Fisher Scientific

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), Sigma-Aldrich

Protaminsulfat, Fisher Scientific

Zinkdibutyldithiocarbamat (ZDBC), Hatano Research Institute, Japan

Zinkdiethyldithiocarbamat (ZDEC), Hatano Research Institute, Japan

3.1.7 Organika

Akkutase, Capricorn Scientific GmbH

Bovines Kollagen Typ I, Thermo Fisher Scientific

Chromogenic LAL (Limulus amoebocyte lysate) Assay Kit, Lonza

Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12), Gibco

Endothelial Basal Medium 2 (EBM2), Lonza

Fetal calf serum (FCS), Fisher Scientific

Lightning-Link Fluorescein Conjugation Kit, Innova Biosciences

Medium 199 (M199), Fisher Scientific

Minimum Essential Media (MEM), Fisher Scientific

MTT Cell Proliferation Assay Kit, Cayman Chemical

Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml (Pen/Strep), Fisher Scientific

Rattenschwanz Kollagen Typ I, Thermo Fisher Scientific

Stromal cell derived factor 1 (SDF-1), Miltenyi Biotec

Virusüberstand (eGFP), Dr. Stefan Stein, Georg Speyer Haus, Universität Frankfurt

Virusüberstand (mCherry), Dr. Stefan Stein, Georg Speyer Haus, Universität Frankfurt

3.2 Methoden

Sämtliche Arbeiten wurden zum Ausschluss von Kontaminationen unter einer Sterilbank der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Es wurde ausschließlich mit Latex-Handschuhen gearbeitet und zwischen den einzelnen Arbeitsschritten erfolgte eine Flächen- und Hilfsmitteldesinfektion.

3.2.1 Zellkultur

Vor dem Auftauen der benötigten Zellreihen wurden die zelllinienspezifischen Nährmedien vorbereitet. Diese wurden wie folgt angesetzt:

für SaOS und hOB:

DMEM/F12 (1:1) 445ml (89%)

+ FCS 50ml (10%)

+ Pen/Strep 5ml (1%)

für NhDF:

DMEM-ATCC 360ml (72%)

+ M199 90ml (18%)

+ FCS 45ml (9%)

+ Pen/Strep 5ml (1%)

für HUVEC:

EBM2 360ml (72%)

+ M199 90ml (18%)

+ FCS 45ml (9%)

+ Pen/Strep 5ml (1%)

für L929:

MEM 445ml (89%)

+ FCS 50ml (10%)

+ Pen/Strep 5ml (1%)

Es wurden Falcon Röhrchen mit je 40ml zellreihenspezifischem Medium vorbereitet. Das Nährmedium wurde dabei stets auf 37°C vorgewärmt. Die Zellreihen wurden nun aus dem Stickstofftank entnommen. Die Ampullen, welche die Zellen enthielten, wurden kurz in der Hand aufgetaut und die Zellen in die jeweiligen Medien pipettiert. Nach kurzem Mischen mit der Pipette erfolgte die Zentrifugation für 5 Minuten bei 1400 UPM. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert, das Pellet aufgelockert und die Zellen pro Zelllinie in 13 ml Medium aufgenommen. Die Aussaat erfolgte in T75-Zellkulturflaschen, welche bei 37°C und 5% atmosphärischer CO₂-Konzentration im Brutschrank inkubiert wurden.

Der Wechsel des Mediums erfolgte alle zwei bis drei Tage. Der Farbwechsel des Mediums zeigte aufgrund der enthaltenen pH-Indikatoren hierzu die Zellvitalität an. Je nach pH-Umschlag und Zeit seit dem letzten vollständigen Wechsel wurde das Nährmedium teilweise oder insgesamt ersetzt. Parallel wurden die Kulturen je nach Zellreihe und Proliferation ab einer Konfluenz von etwa 90% in der Mikroskopie passagiert. Hierzu wurde das Medium zunächst abgesaugt wobei die adhärennten Zellen am Flaschenboden verblieben. Nach dem Spülen mit 12ml Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) pro Kulturflasche folgte ihr Ablösen mittels 2ml Akkutase. Dies geschah auf Wärmeplatten bei ca. 37°C zur Beschleunigung der Enzymaktivität. Diese wurde, sobald die Zellen sich vollständig gelöst zeigten, mittels 10ml spezifischem Medium beendet. Nun wurde die Kultur je nach zuvor festgestellter Zelldichte gesplittet, in weiteren Kulturflaschen ausgesät und das Medium auf 13ml pro Flasche aufgefüllt.

3.2.2 Zellzählung

Die Zellzählung zur Quantifizierung der Zellpopulation für die weiteren Versuche erfolgte mit dem Automated Cell Counter der Firma Luna. Hierzu wurden die durch das Ablösen von der Kulturflasche und Zentrifugieren entstandenen Zell-Pellets aufgeschüttelt und in jeweils 2ml PBS gelöst. Eine Probe von 20 µl wurde auf einen Objektträger pipettiert und in das Gerät eingebracht. Nach dem Fokussieren wurde die Zählung gestartet und das Ergebnis in Zellen pro Milliliter ausgegeben.

3.2.3 Virustransduktion von Fluoreszenzgenen

Zur visuellen Auswertung der Zellkulturen im 3D-Modell sollten diese unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Hierzu war die Virustransduktion von Fluoreszenzgenen auf die zu untersuchenden Zellreihen notwendig, wozu Virusüberstand vom Georg Speyer Haus in Frankfurt verwendet wurde. Es wurden für die Zellreihen verschiedene Fluoreszenzfarben gewählt, um eine Kontrastierung bei gemischten Kulturen zu ermöglichen. Daher wurden SaOS und hOB mit eGFP grün transduziert, während NhDF und HUVEC mit mCherry rot transduziert wurden. Hierzu wurden die Zellreihen nach dem Auftauen in je einer 24-Well-TC-Platten ausgesät. Nach dem Absaugen des alten Mediums wurden pro Well 500µl neues spezifisches Medium sowie 1µl Protaminsulfat hinzupipettiert. Weiterhin wurden 20µl Virusüberstand zur Transduktion des grünen, respektive roten Fluoreszenzgens zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden im Brutschrank bei 37°C wurde das Virus-tragende Medium abpipettiert und entsorgt. Die adhärennten Zellkulturen wurden mit PBS gewaschen und anschließend neues spezifisches Medium zugegeben. Dem neuen Medium wurden insgesamt 20% FCS (Fetal calf serum) hinzugegeben, um den durch die Transduktion induzierten Stress durch ein passager erhöhtes Nährstoffangebot zu kompensieren. Gleichsam wurde am folgenden Tag das Medium abgesaugt, die Kultur mit PBS gespült und erneut Medium mit 20% FCS-Gehalt zugegeben.

3.2.4 Fluorescence-activated cell sorting (FACS-Durchflusszytometrie)

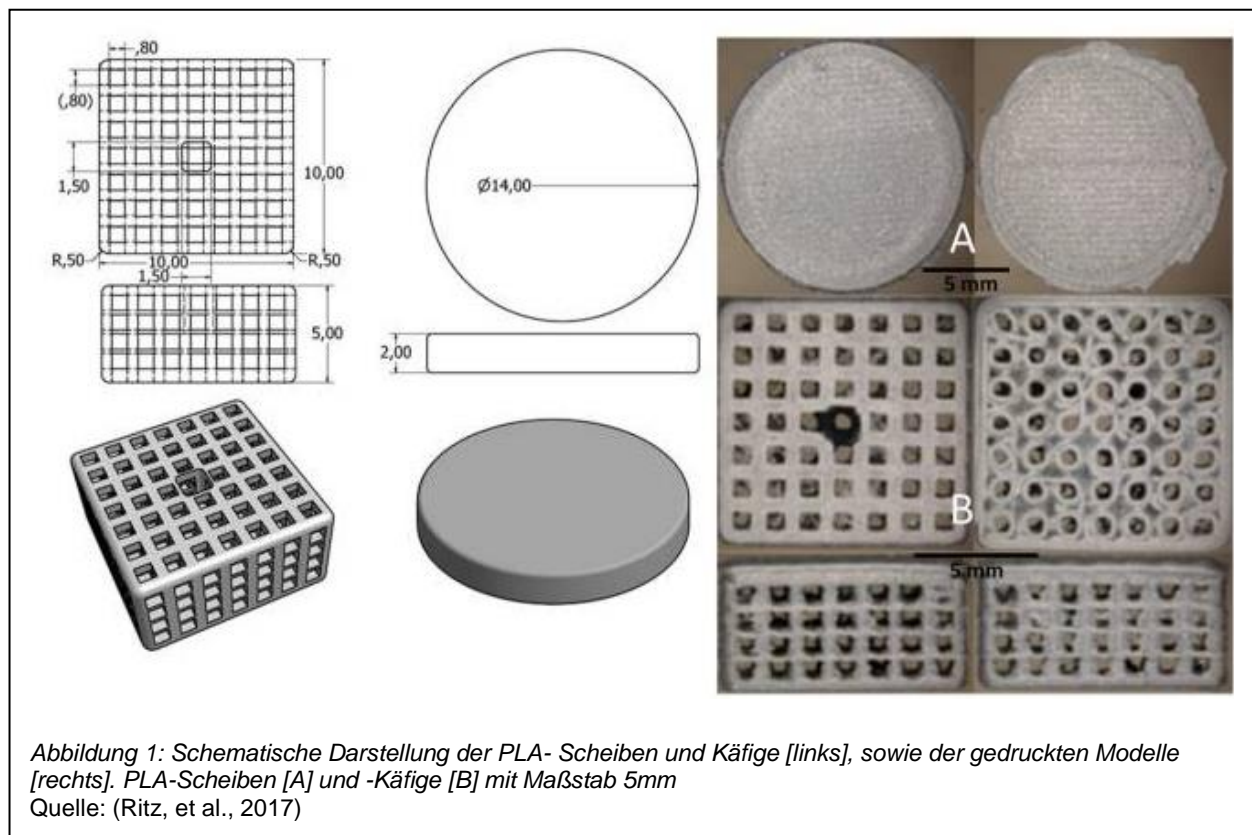
Zur Überprüfung der durch die Virustransduktion erreichten Fluoreszenzrate der Zellreihen wurden diese wie bereits beschrieben von den Kulturflaschen abgelöst und zentrifugiert. Das entstandene Zell-Pellet wurde in 2ml PBS resuspendiert. Es folgte eine Zellzählung (s.

2.2.2). Weiterhin wurden 400.000 Zellen abpipettiert, erneut zentrifugiert und in 600µl PBS gelöst. Diese wurden auf zwei FACS-Röhrchen zu je 300µl aufgeteilt und bis zur Messung der Fluoreszenzrate auf Eis aufbewahrt.

In der Durchflusszytometrie wurden in Suspension vorliegende Zellen durch einen Hüllstrom fokussiert und durch eine sehr dünne Glasküvette geleitet, welche die Einzelbetrachtung der Zellen ermöglichte. Diese wurden durch einen monochromatischen Laserstrahl geleitet. Bei Auftreffen des Strahls auf die Zelle kam es zu einer Streuung des Lichts, welches wiederum detektiert wurde. Die Intensität und Wellenlänge des Streulichts korrelierte mit Zelleigenschaften. Dabei war die Vorwärtsstreuung [Forward Scatter = FSC] ein Maß für ihre Größe und die Seitwärtsstreuung [Side Scatter =SSC] ein Maß für ihre Zusammensetzung.

Die Messung wurde zur Qualitätssicherung zweifach durchgeführt und zusätzlich mit einer Probe PBS ohne Zellen verglichen. Das Verfahren wurde für alle vier Versuchszellreihen wiederholt um die Effizienz der Virustransduktion vor den weiteren Versuchsreihen, welche eine visuelle Auswertung notwendig machten, sicherzustellen. Bei nicht suffizienter Fluoreszenz wurde die Virustransduktion wiederholt (s. 2.2.3).

3.2.5 Erstellen und Vorbereiten der PLA-Modelle



Mit der Software Autodesk Inventor 2013 wurden die Modelle wie in Abbildung 1 zu sehen für den 3D-Druck vorbereitet [links]. Die Herstellung selbst erfolgte mit dem 3D-Drucker Ultimaker 2+. Nach Modell-Druck und dem Abtrennen des Drucküberstands hatten die PLA-Scheiben einen Durchmesser von 14mm bei einer Dicke von 1,5mm. Die PLA-Käfige bestanden aus Quadern mit einer Grundfläche mit einer gleichseitigen Kantenlänge von 10mm bei einer Höhe von 5mm und einer porösen Gitterstruktur [rechts].

Sowohl die Scheiben als auch die Käfige wurden zur Reduktion möglicher Endotoxinkontaminationen nach dem Druck in Suspensionskulturplatten gesetzt und für 48 Stunden in Isopropanol 70% gelegt. Anschließend wurden sie einmal mit 2ml und zweimal mit 1ml PBS gespült und 30 Minuten zum Trocknen stehen gelassen. Nach dem Umsetzen in eine neue Suspensionskulturplatte mit einer Pinzette erfolgten zwei Spülungen in für die jeweilige Zellreihe vorgesehenen Medium mit einer Inkubationszeit von je 5 Minuten. Abschließend wurden die Modelle für weitere 12 Stunden in den jeweiligen Medien belassen.

3.2.6 Limulus ameocyte lysate (LAL)-Assay

Limulus ameocyte lysate (LAL) wird aus dem Blut des amerikanischen Pfeilschwanzkrebse (*Limulus polyphemus*) gewonnen. Es reagiert mit bakteriellen Endotoxinen, indem es an Lipopolysaccharide (LPS) bindet, welche Membranbestandteile von gramnegativen Bakterien sind, und kann daher zu deren Nachweis genutzt werden.

Zur Durchführung des Versuchs wurden zunächst PLA-Käfige entsprechend des vor der Zellaussaat vorgesehenen Spülprotokolls vorbereitet. Nach dem zweifachen Waschen in PBS wurden diese jedoch zusätzlich zweimal in Aqua ad iniectabilia gespült. Weiterhin wurden die PLA-Käfige in eine neue Suspensionskulturplatte umgesetzt und in 1ml Aqua ad iniectabilia inkubiert. Parallel wurde zum Ausschluss einer Kontamination des Aqua ad iniectabilia eine Probe in eine zweite 24-Well-Platte gegeben. Nach Ablauf von 24 und 48 Stunden wurden Proben von den PLA-Modellen entnommen.

Zum Ansetzen der LAL-Kontroll-Lösung wurden zunächst das Control Standard Endotoxin (CSE) und 1ml LAL-Reagent-Water (LRW) für 15 Minuten mit einem Vortexer gemischt. Es wurden auf Basis der vorgegebenen Endotoxin-Potenz Lösungen mit 1; 0,5; 0,25 und 0,01 EU/ml Endotoxin in LRW angesetzt, welche für eine Minute gemischt wurden.

Nun wurden die erstellten Konzentrationen zusätzlich zu einer Negativ-Kontrolle mit reinem LRW auf eine 96-Well-Microplate aufgetragen. Neben der Konzentrationsreihe und Negativ-

Kontrolle wurden Proben des mit den PLA-Modellen inkubierten Aqua ad iniectabilia, sowie des nicht-inkubierten Aqua ad iniectabilia aufgetragen. Es wurden jeweils 50µl pipettiert.

Zum Startzeitpunkt des Versuchs (T= 0 Min) wurden nun je 50µl LAL-Lösung pro Well beigegeben und die Platte für eine gleichmäßigere Vermischung vorsichtig geklopft. Um die zeitliche Verschiebung möglichst gering zu halten, wurde eine Mehrfachpipette verwendet. Nach Inkubation auf einer Wärmeplatte bei 37°C für 10 Minuten wurden jeweils 100µl chromogenes Substrat zu pipettiert, welches in 6,5ml vorgewärmtem LRW gelöst war. Es folgte eine weitere Inkubationszeit von 6 Minuten, wonach 100µl Reagenz zum Beenden der Reaktion beigegeben wurden. Die Absorption der Proben wurde bei 410nm gemessen und die Ergebnisse in einer Tabelle aufgetragen.

So konnte eine Standardkurve der Endotoxinkonzentration erstellt werden. Es erfolgte die Quantifizierung der bakteriellen Kontamination in den Proben, welche zur Auswertung in Relation mit dem Grenzwert der Food and Drug Administration (FDA) von 0,5 EU/ml gesetzt wurde.

3.2.7 MTT-Assay zur Prüfung der Biokompatibilität

Zum Nachweis der Biokompatibilität der PLA-Modelle wurde ein MTT-Assay entsprechend der International Organisation for Standardization(ISO)-Norm 10993-5 durchgeführt.

Zu Beginn des Versuchs wurden zur Herstellung der MTT-Lösung je 1mg MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid] in 1ml Medium gelöst und steril filtriert.

Weiterhin wurden L929 Zellen herangezogen und in einer 96-Well-Platte mit pro Well 10.000 Zellen in 100µl Medium ausgesät. Es wurden 3 Käfig-Modelle gedruckt und in einer Suspensionskulturplatte für 24 Stunden mit Isopropanol 70% bedeckt. Im nächsten Schritt wurde das Isopropanol abgesaugt. Nachdem die Käfige getrocknet waren, wurden sie wie zur Vorbereitung vor der Zellaussaat zweifach in PBS gewaschen und in eine neue Suspensionskulturplatte umgesetzt. Zuletzt wurden jedem Käfig 1,1ml L929-spezifisches Medium zugegeben.

Nach Ablauf der jeweils gesetzten Inkubationszeit von 12, 24 und 48 Stunden wurden die Käfige mit einer sterilen Pinzette entfernt. Nach zeitgleicher Entfernung der Käfige wurden pro zu testender Medium-Probe zehn mit L929 besetzte Wells mit je 100µl befüllt. Zudem wurden zwei Negativ-Proben die zytotoxischen Agenzien Zinkdiethyldithiocarbamat (ZDEC) und Zinkdibutyldithiocarbamat (ZDBC) beigelegt und eine Positiv-Probe mit nicht PLA-inkubiertem Medium aufgetragen. Nach 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C wurde sämtliches Medium abgesaugt und jeweils 50µl MTT-Lösung in die Wells pipettiert. Die 96-

Well Platte wurde erneut für 2 Stunden in den Brutschrank zur Inkubation verbracht. Es kam durch mitochondriale Dehydrogenasen vitaler Zellen zu einer Metabolisierung des membrangängigen MTT-Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid [gelb] zum MTT-Formazan [blau]. Weiterhin wurden die MTT-Lösung abgenommen und stattdessen 100µl Isopropanol aufgetragen. Die folgende kolorimetrische Messung der Extinktion erfolgte bei 570nm in einem Multiwell-Spectrophotometer. Abschließend folgte eine Auswertung der metabolischen Zellaktivität pro Probe im Vergleich zum Mittel der unbeeinflussten Medium-Proben, deren metabolische Aktivität mit 100% gleichgesetzt wurde.

3.2.8 Herstellung des bovinen und Rattenschwanz Kollagen-Trägermediums

Die Kollagengele, welche im Käfig-Modell als extrazelluläre Matrix dienen, wurden auf Eis angesetzt. Der bovine Stock enthielt hierbei 6mg Kollagen Typ I pro Milliliter und der Rattenschwanz-Stock 3,12mg pro Milliliter. 3ml Gel setzten sich daher jeweils wie folgt

[µl]	Rattenschwanz	Bovin
M199	300	300
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)	90	90
Natriumhydroxid (NaOH)	34,5	34,5
Kollagen Typ I	1920	1000
Aqua ad iniectabilia (H₂O)	655	1570

Tabelle 1: Zusammensetzung der Kollagengele auf Basis von Rattenschwanz und bovinem Kollagen [µl]
 Quelle: Eigene Darstellung

zusammen:

3.2.9 Zellaussaat auf PLA-Modellen



Abbildung 2: 3D- Druck eines Scheiben-Modells mit dem 3D-Drucker Ultimaker 2+ vor Abtrennen des PLA-Überstands
Quelle: Eigene Darstellung

Die PLA-Modelle wurden wie in Abbildung 2 dargestellt mit dem 3D-Drucker der Firma Ultimaker hergestellt, von PLA-Überstand befreit und wie in Abbildung 3 zu sehen in 24-Well-



Abbildung 3: PLA-Scheiben vorbereitet zur Zellaussaat in 24-Well-Suspensionskulturplatte nach Absaugen des spezifischen Mediums
Quelle: Eigene Darstellung

Suspensionskulturplatten gelegt.

Weiterhin wurden das etablierte Spülprotokoll durchgeführt und letztlich die Scheiben für 12 Stunden mit spezifischem Medium für die jeweiligen Zellreihen bedeckt.

In der ersten Versuchsreihe erfolgte die Aussaat der Zellen auf die Scheiben-Modelle wie in Abbildung 3 vorbereitet. Es wurde zunächst das Medium aus den Suspensionskulturplatten mit den vorbereiteten Scheiben abgesaugt und durch neues zellspezifisches Medium ersetzt. Die entsprechenden Zellen wurden wie beschrieben aus den Kulturflaschen abgelöst und zentrifugiert. Es wurden pro Zellreihe vier Wells mit zweimal 50.000 und zweimal 100.000 Zellen bestückt und je 1ml spezifisches Medium hinzupipettiert.

In der späteren Zwischenbewertung zeigte sich eine bessere Proliferation bei den mit 100.000 Zellen bestückten Scheiben, sodass in der zweiten Versuchsreihe lediglich zwei Wells mit jeweils 100.000 Zellen pro Scheibe angesetzt wurden.

In der abschließenden Versuchsreihe mit dem Scheiben-Modell wurde der Versuchsaufbau um einen Überzug des PLA mit Rattenschwanz oder bovinem Kollagen ergänzt. Hierzu wurden die wie gehabt vorbereiteten Scheiben vor der Aussaat der Zellen für eine Stunde in eine Kollagenlösung gelegt. Zur Herstellung dieser wurde das jeweilige Kollagen zuvor im Verhältnis 1:100 in PBS gelöst. Weiterhin folgten das Umsetzen in spezifisches Medium und die Zellaussaat. Es wurden vier Scheiben pro Zellreihe angesetzt, hiervon zwei mit 50.000 und zwei mit 100.000 Zellen besetzt. Dieser Aufbau wurde sowohl für den Versuch mit Rattenschwanz als auch mit bovinem Kollagenüberzug vorbereitet. Die Zellproliferation wurde in einem Zeitraum von bis zu 13 Tagen wiederholt gemessen (s. 2.2.11) und zur Auswertung graphisch dargestellt.

Zur Aussaat in den wie beschrieben gespülten Käfig-Modellen wurden die vorbereiteten Zellen in Kollagengel resuspendiert. In der ersten Versuchsreihe wurden 200µl und 600µl und später, aufgrund der gleichmäßigeren Gelverteilung, stets 500µl Gel verwendet. Weiterhin wurden die Modelle für 60 Minuten bei 37°C im Brutschrank polymerisiert, um das Gel im Käfig zu immobilisieren.

Es erfolgte die Aussaat von 230.000 hOB, 250.000 SaOS und HUVEC oder 280.000 NhDF pro Well und Käfig. Dies wurde je zweimal mit bovinem und ebenso zweimal mit Rattenschwanz Kollagen wiederholt. In den späteren Versuchsreihen wurden zur besseren Vergleichbarkeit stets 200.000 Zellen einer Linie pro Käfig eingesetzt.

Neben den beschriebenen Monokulturen wurden nach gleichem Protokoll vorbereitete Kulturen im Käfig-Modell angelegt, welche sowohl hOB als auch HUVEC enthielten. Dies geschah zur visuellen Beurteilung der Zellinteraktion in Mischkulturen, welche mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet wurden.

Das Füttern der in die Käfige eingebrachten Zellen erfolgte alle zwei bis drei Tage durch Abpipettieren von 0,5ml spezifischem Medium und Beigeben der gleichen Menge frischen Mediums. Hierbei wurde auf eine möglichst geringe Manipulation der Käfige selbst geachtet.

3.2.10 Fluoreszenzmikroskopie

Die visuelle Auswertung des Verhaltens der im 3D-Käfig-Modell ausgesäten Zellen wurde durch ein EVOS Fluoreszenzmikroskop ermöglicht. Hierzu war zuvor die Virustransduktion von grünem und roten Fluoreszenzgen auf die Zelllinien erfolgt (s. 2.2.3). Das Mikroskop ermöglichte die Ansicht im grünen und roten Fluoreszenzspektrum sowie die Superposition der Bilder bei Cokulturen mit Zelllinien beider Fluoreszenzfarben.

3.2.11 Zellvitalitätsprüfung mittels Resazurin

Zur Prüfung der Zellvitalität nach Aussaat auf den unbehandelten sowie den kollagenüberzogenen PLA-Modellen wurde das Fluorometric Cell Viability Kit I von PromoCell verwendet. Der enthaltene, nicht zytotoxische Farbstoff Resazurin [blau] ist ein Reduktions/Oxidations (RedOx) -Indikator. Seine irreversible Umsetzung zu Resorufin [rosa] korreliert mit dem RedOx-Potential einer Zelle und damit ihrer metabolischen Aktivität. Die Umsetzungsrate von Resazurin sinkt somit bei reduzierter Zellvitalität und kann zu deren Quantifizierung genutzt werden.

Hierzu wurde das Nährmedium der auf den PLA-Scheiben adhärenen Zellen vollständig abgesaugt und verworfen. Es wurden pro Scheibe 450µl spezifisches Medium sowie 50µl des Fluorometric Cell Viability Kit hinzupipettiert, so dass eine zehnpromtente Resazurin-Lösung entstand. Weiterhin wurden die Modelle 4 Stunden im Brutschrank inkubiert.

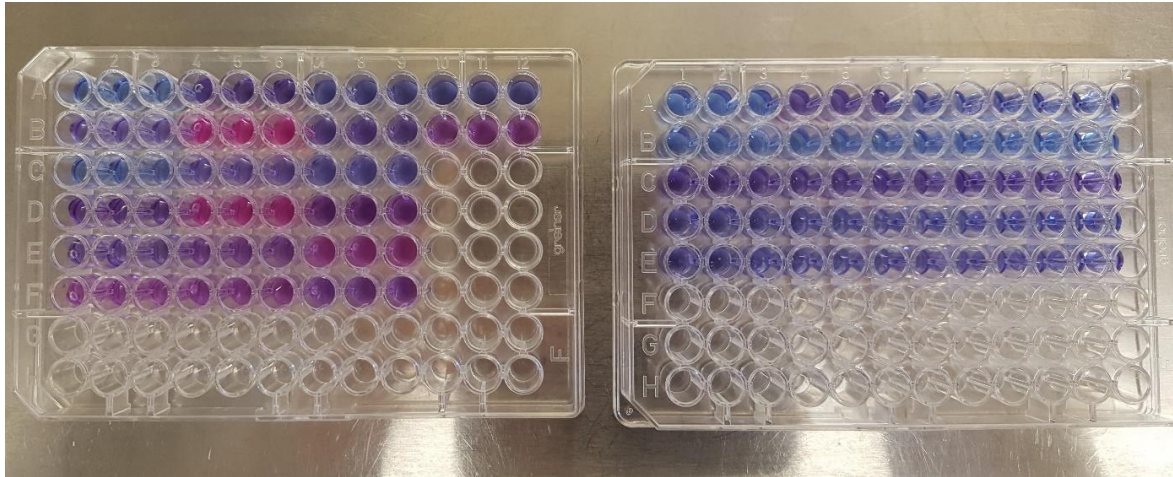


Abbildung 4: Medium von den auf PLA-Scheiben ausgesäten Zellen nach 4 Stunden Inkubation mit Resazurin [blau] je dreifach auf 96-Well-Platten aufgetragen. Der Farbumschlag zum Metaboliten Resorufin [rosa] zeigt das Maß der Zellvitalität an, welche in der Fluoreszenzmessung quantifiziert wird
Quelle: Eigene Darstellung

Pro getestetem Scheiben-Modell wurden drei Messungen durchgeführt, hierzu wurden jeweils 100µl umgebendes Medium wie in Abbildung 4 dargestellt auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Als ebenfalls dreifache Negativ-Kontrolle wurde zellfreies Medium mit 10% Resazurin-Anteil verwendet. Es erfolgte die Absorptionsmessung mit dem GlomaxMulti+ Detectionssystem der Firma Promega bei 570nm und 600nm. Diese Prüfung wurde sowohl für die 12 Scheiben-Modelle der ersten Generation (3 pro Zellreihe) als auch die 16 Modelle der zweiten Generation (4 pro Zellreihe) und die 32 Modelle der dritten Generation (4 pro Zellreihe für Rattenschwanz und bovines Kollagen) durchgeführt und die Ergebnisse zur Auswertung in Excel-Tabellen aufgetragen.

3.2.12 Freisetzungskinetik des Wachstumsfaktors SDF-1

Stromal cell derived factor 1 (SDF-1) ist ein aus 89 Aminosäuren bestehendes Chemokin, welches durch Osteoblasten, Fibroblasten und Endothelzellen produziert wird. Durch Bindung an den CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR-4) ist es mitbeteiligt an der Adhäsion, Proliferation und Röhrenbildung von Endothelzellen. Dies geschieht durch die Rekrutierung von endothelialen Vorläuferzellen. SDF-1 wurde daher herangezogen um die Endothelialisierung durch die HUVEC Zellenreihe im in-vitro PLA Modell zu fördern.

Zur Bestimmung der SDF-Freisetzungskinetik bei im Kollagengel gebundenen SDF-1 wurde zunächst ein Stock von 1mg/ml SDF-1 angesetzt. Hierzu wurden 100µl PBS zu 100µg SDF-1 hinzupipettiert. Zur späteren Auswertung war eine Visualisierung des SDF-1 notwendig. Dies wurde durch eine Fluoreszenzmarkierung des Moleküls mittels LightningLink Rapid in grüner

Farbe erreicht. Der SDF-1 Lösung wurden 10µl LightningLink-Rapid-Modifier zugegeben und diese vorsichtig gemischt. Es folgte die Inkubation entsprechend des Rapid-Protokolls für 15 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Zum Beenden der Reaktion wurden der Lösung 10µg LightningLink-Rapid-Quencher zugegeben und erneut vorsichtig gemischt. Die nun fluoreszenzmarkierte SDF-1 Lösung konnte nach Angaben des Herstellers (Innova Biosciences) für 18 Monate im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden. Alternativ konnte eine längere Lagerung bei -20°C im Gefrierschrank erfolgen. Der Lösung wurden weitere 80µl PBS hinzupipettiert, sodass eine SDF-1 Konzentration von 500ng/µl resultierte. Es wurden zur späteren Nutzung im mit Endothelzellen besetzten Käfig-Modell 10µl dieser Konzentration im Gefrierschrank archiviert.

Die verbliebenen 190µl wurden 1:10 in PBS gelöst. Es sollte nun eine Standardkurve der Fluoreszenz entsprechend der SDF-1 Konzentration erstellt werden. Hierfür wurden je 25ng, 50ng, 75ng, 100ng, 200ng, 300ng, 400ng und 500ng in eine 96-Well-Platte pipettiert und auf einen Gesamteinhalt pro Well von 100µl mit PBS aufgefüllt. Die beschriebenen Verdünnungen wurden jeweils dreifach vorbereitet und drei Negativ-Proben mit reinem PBS ergänzt. Die in der Fluoreszenzmessung festgestellten Werte wurden gemittelt und in einer Standardkurve aufgetragen.

Um im nächsten Schritt die SDF-1 Freisetzungskinetik zu analysieren, wurden 500ng, also je 1µl der archivierten Lösung, in 500µl bovinem Kollagengel im Standard Käfig-Modell angesetzt. Nach der Polymerisierung des Gels wurden die Käfige mit PBS bedeckt und zu verschiedenen Zeitintervallen auf ihre Fluoreszenz untersucht. Die Messungen erfolgten nach 1, 2, 4, 18, 24, 29 und 48 Stunden, der Überstand wurde jeweils vollständig abpipettiert und ersetzt. Anhand der zuvor erstellten Standardkurve konnten nun Fluoreszenz und SDF-1 Gehalt in der den Käfig umgebenden Lösung korreliert und graphisch dargestellt werden.

3.2.13 Zugabe von Wachstumsfaktor SDF-1 im HUVEC Käfig-Modell

In der abschließenden Versuchsreihe wurde jeweils mit 500ng SDF-1 beladenes bovines Kollagengel in Käfig-Modellen immobilisiert. Im nächsten Schritt wurden Endothelzellen auf der Modelloberfläche ausgesät. Parallel wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, welche die Aussaat von im Gel immobilisierten HUVEC bei ebenso SDF-1 beladenem Kollagen vorsah. Die resultierenden Proliferations- und Verteilungsmuster wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop bewertet. Die Wechselfrequenz des HUVEC-spezifischen Mediums wurde zur Präservierung des im Überstand enthaltenen SDF-1 so gering wie möglich gehalten. Alle zwei bis drei Tage wurden 0,5ml des Nährmediums ersetzt.

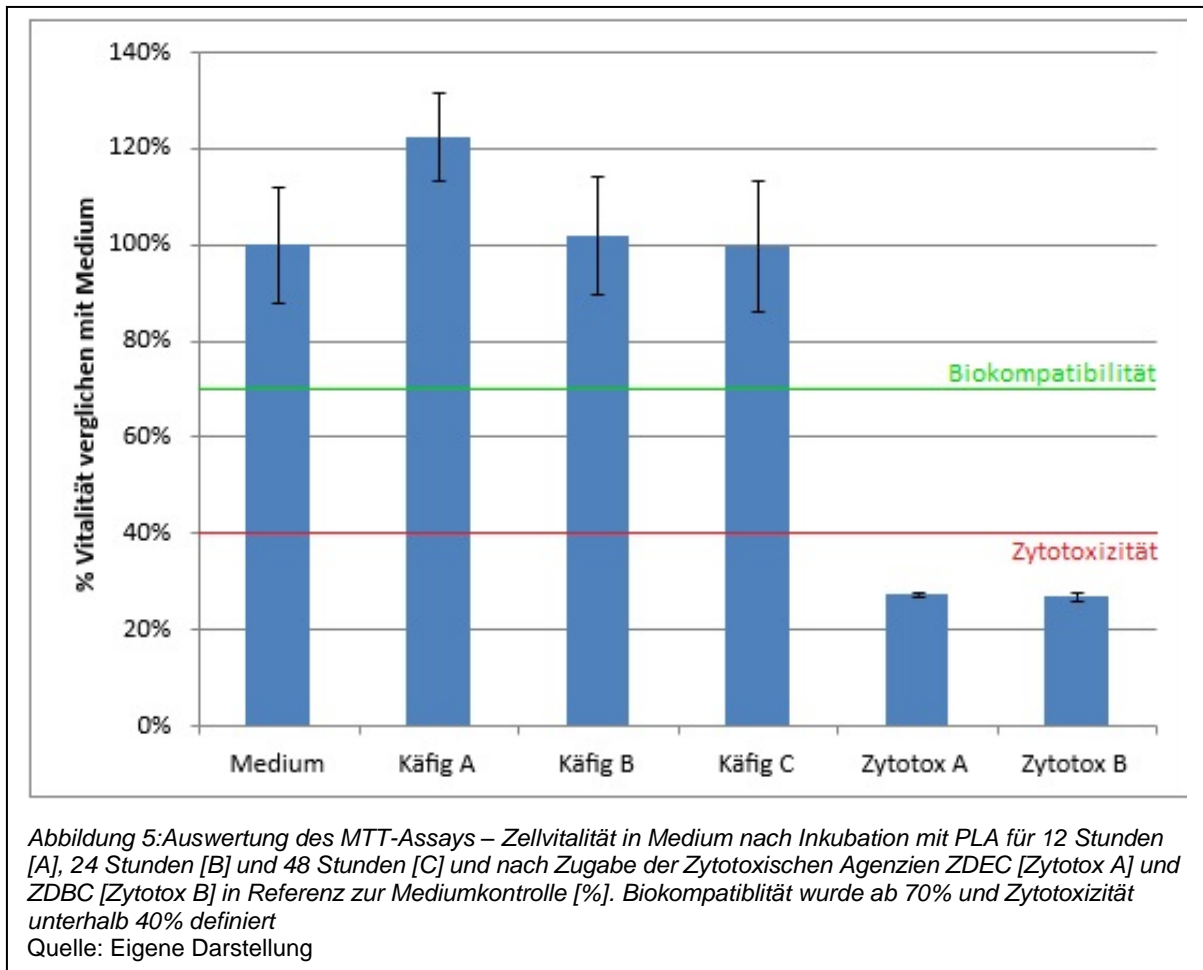
4 Ergebnisse

4.1 Biokompatibilität und Ausschluss von Endotoxinkontaminationen

4.1.1 Biokompatibilitätsprüfung der Modelle

Mit Hilfe eines 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assay wurde die Biokompatibilität der PLA-Modelle geprüft. Hierzu wurden murine Fibroblasten der Zellreihe L929 in mit PLA inkubiertem Medium herangezogen und ihre Proliferation im Vergleich zu Kulturen in PLA freiem Medium gesetzt. Als Positivkontrolle wurden Kulturen verwendet, denen die zytotoxischen Agenzien ZDEC (Zinkdiethyldithiocarbamat) und ZDBC (Zinkdibutyldithiocarbamat) zugegeben worden waren. Dies geschah entsprechend der Norm des Deutschen Instituts für Normung, auf Grundlage der europäischen Norm, auf Grundlage der International Organisation for Standardization -Norm (DIN-EN-ISO-Norm) 10993-5, welche als internationaler Standard der Prüfungen von Medizinprodukten und deren Ausgangsstoffen auf In-vitro-Zytotoxizität dient.

Der Farbstoff MTT [gelb] wurde durch vitale Zellen zu seinem Metaboliten MTT-Formazan [blau] verstoffwechselt. Dieser Metabolit konnte in der Spektrophotometrie durch eine erhöhte Absorption im Wellenlängenbereich von 570nm nachgewiesen werden. Dabei war die Absorption proportional zur vitalen Zellpopulation.



In Abbildung 5 wurden die Negativkontrolle im Sinne einer in unbeeinflusstem Medium aufgezogenen Zellpopulation, sowie die Positivkontrolle nach Zugabe von zytotoxischen Agenzien [Zytotox A (ZDEC); Zytotox B (ZDBC)] dargestellt. Weiterhin wurden hiermit die für 12 Stunden [Käfig A], 24 Stunden [Käfig B] und 48 Stunden [Käfig C] in PLA inkubierten Medium aufgezogenen Zellpopulation verglichen. Aufgezeigt wurde jeweils die mediane Absorption einer Probe sowie deren Standardabweichung in Prozent der Negativkontrolle [Medium], welche mit 100% gleichgesetzt wurde. Als Biokompatibilität wurde entsprechend der Iso-Norm 10993-5 eine Vitalität von mindestens 70% der Mediumkontrolle definiert. Als hohe Zytotoxizität wurde eine Vitalität von weniger als 40% der Mediumkontrolle festgelegt.

Die beiden Positivkontrollen zeigten eine deutlich reduzierte Absorption im geprüften Spektrum, was auf eine reduzierte Menge enthaltenes MTT-Formazan hinwies. Dies wiederum ließ auf eine verringerte aktiv metabolisierende Zellpopulation schließen. Es kam also zum Zelltod aufgrund der Beigabe der zytotoxischen Agenzien.

Gleichzeitig waren die Proben von Käfig 1 und 2 mit der unbeeinflussten Mediumkontrolle gleichzusetzen. Somit war darauf zu schließen, dass die Inkubation des Mediums mit den PLA-Modellen bis zu 48 Stunden nicht zu einer zytotoxischen Verunreinigung dieser führte.

Tatsächlich war die Vitalität der Zellpopulation der für 12 Stunden mit PLA-inkubierten Probe sogar höher als durch die Negativkontrolle zu erwarten war.

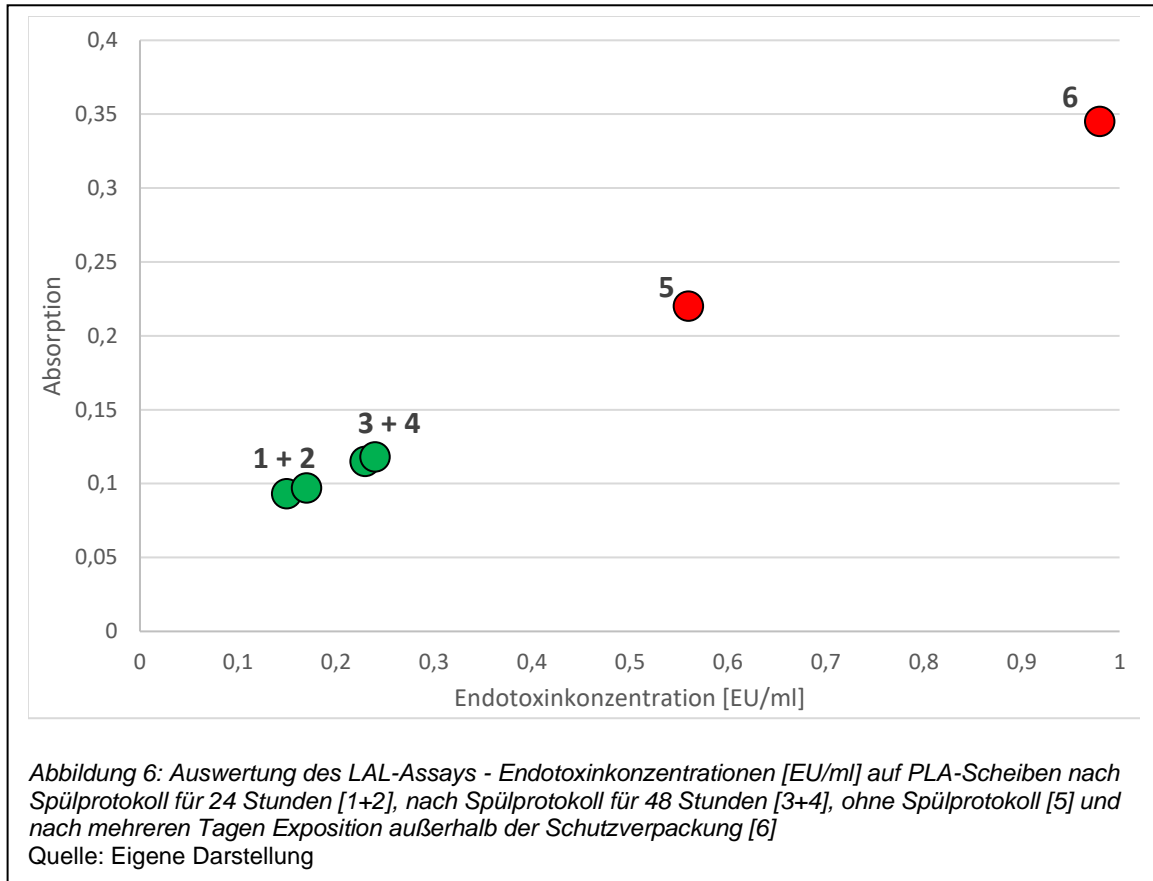
Somit wurde bewiesen, dass durch die PLA-Modelle in der vorgestellten Arbeit keine relevanten zytotoxischen Agenzien in den Versuch eingebracht wurden. Gleichzeitig wurde die DIN-EN-ISO-Norm 10993-5 zur Prüfung von Medizinprodukten und deren Ausgangsstoffen auf In-vitro-Zytotoxizität erfüllt.

4.1.2 Ausschluss von Endotoxinkontaminationen

Endotoxine sind Bestandteile von Lipopolysacchariden auf der äußeren Zellmembran von gramnegativen Bakterien. Sie haben die Eigenschaft bei Einbringung in den menschlichen Körper bereits in kleinsten Mengen Entzündungsreaktionen zu induzieren. Die Einbringung von Endotoxinen kann weiterhin Reaktionen bis hin zum septischen Schock zur Folge haben.

Aus diesem Grund wurde ein Limulus amoebocyte lysate (LAL)-Assay durchgeführt, welches eine Kontamination der PLA-Modelle mit Endotoxinen während deren Druck oder Vorbereitung zur Befüllung mit Kollagengel ausschließen sollte. Hierzu diente Limulus-Amöbozyten-Lysat, ein Extrakt aus dem Blut des amerikanischen Pfeilschwanzkrebses, welcher an Lipopolysaccharide und damit Endotoxine gramnegativer Bakterien bindet, und diese somit detektierbar macht.

Die Quantifizierung der bakteriellen Kontamination wurde zur Auswertung in Relation mit dem FDA-Grenzwert von 0,5 EU/ml (Endotoxin-Units pro Milliliter) gesetzt.

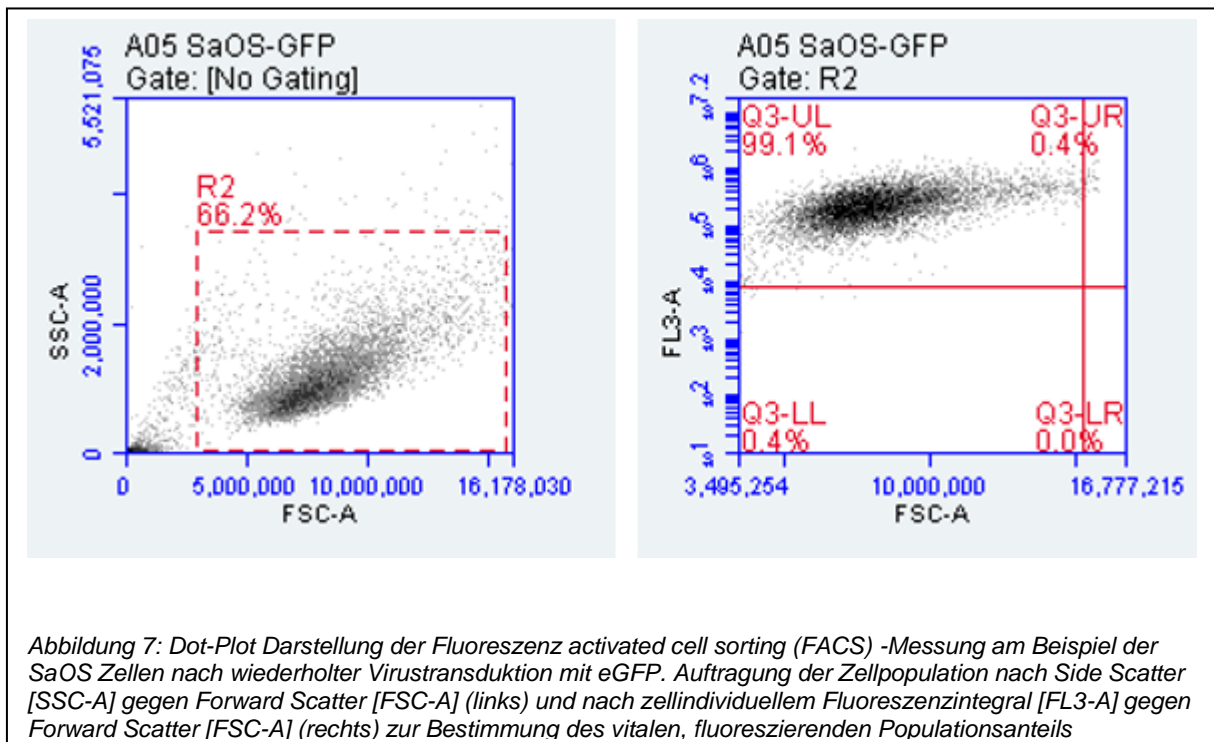


Die Berechnung der Endotoxinkonzentration pro Probe erfolgte anhand der gemessenen Absorption der Proben, welche mit dieser korrelierte. Es wurden Proben nach Desinfektionsprotokoll und Inkubation von 24 Stunden [1; 2] und 48 Stunden [3; 4] in Medium sowie eine Probe des unbehandelten PLA-Werkstoffs vor 3D-Druck und Desinfektion [5] und nach mehreren Tagen außerhalb der Schutzverpackung [6] verglichen.

Abbildung 6 zeigt, dass sich die Endotoxinbelastung der entsprechend dem Versuchsprotokoll vorbereiteten PLA-Modelle deutlich unter dem vorgeschriebenen Grenzwert von 0,5 EU/ml befindet. Dies galt sowohl für die 24 Stunden [1; 2], als auch die 48 Stunden [3;4] in Medium inkubierten Modelle. Die nicht vorbehandelten PLA-Scheiben [5] zeigten hingegen eine den Grenzwert der FDA überschreitende Endotoxinkonzentration und wären somit für eine Verwendung als Medizinprodukt nicht geeignet. Die Endotoxinbelastung war nach mehreren Tagen der Exposition [6] nochmals deutlich erhöht.

4.2 Erfolgskontrolle nach Virustransduktion von Fluoreszenzgenen

Nach der Virustransduktion des kirschtoten Fluoreszenzgens mCherry auf die Zellen HUVEC und NhDF und des grünen Fluoreszenzgens eGFP auf die Zellen SaOS und hOB, wurde deren Fluoreszenzrate überprüft. Dies erfolgte im Rahmen einer Durchflusszytometrie mit je 400.000, welche die Zahl der fluoreszierenden Zellen maß, um deren Anteil an der Gesamtpopulation zu errechnen. Dieses System heißt Fluoreszenz activated cell sorting (FACS).



Im in Abbildung 7 dargestellten Dot-Plot wurden zunächst Forward Scatter [FSC-A] und Side Scatter [SSC-A] gegeneinander aufgetragen, welche jeweils das Integral des erfassten Lichtsignals darstellen (Abb. 3 links). Anhand des entstandenen Streubildes konnte der Datensatz auf die vitale Zellpopulation, welche durch eine Verdichtung der Messwerte zu erkennen war, eingegrenzt werden. Somit wurden Messfehler, avitale Zellen und mögliche Verunreinigungen durch Fremdpartikel von der Berücksichtigung ausgeschlossen. Im nächsten Schritt wurde ein Dot-Plot der vitalen, durchschnittlichen Zellpopulation erstellt, welcher das FFS-A gegen die registrierte Fluoreszenzintegral [FL3-A] der einzelnen Zellen aufzeigte (Abb. 3 rechts). Diese Darstellung ermöglichte erneut die Eingrenzung der Messwerte durch Setzen einer Mindestfluoreszenz sowie, soweit notwendig, den Ausschluss von grob abweichenden Ergebnissen, welche auf Messfehler oder Verunreinigungen zurückzuführen waren. Es resultierte eine graphisch dargestellte Aufspaltung der

fluoreszierenden Zellpopulation im Vergleich zur gesamten vitalen Zellpopulation in vier Quadranten [UL- upper left; UR- upper right; LL- lower left; LR- lower right]. Das beschriebene Vorgehen wurde für jede Zellreihe zweifach durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Als Mindestwert der Fluoreszenzrate wurden 80% der Population festgelegt, um eine adäquate Visualisierbarkeit in der folgenden Fluoreszenzmikroskopie zu gewährleisten.

Die Messergebnisse der Zellreihen NhDF (96,9%), hOB (89,8%) und HUVEC (99,3%) erfüllten dieses Kriterium in der initialen Messung. Die Zellen der SaOS-Reihe hingegen zeigten lediglich eine Fluoreszenzrate von etwa 41%. Es wurde eine erneute Virustransduktion mit grünem Fluoreszenzgen durchgeführt. Die Kontrollmessungen ergaben anschließend eine mittlere Fluoreszenzrate von 99% und somit ein suffizientes Ergebnis der wiederholten Virustransduktion.

4.3 Fluoreszenzmikroskopie

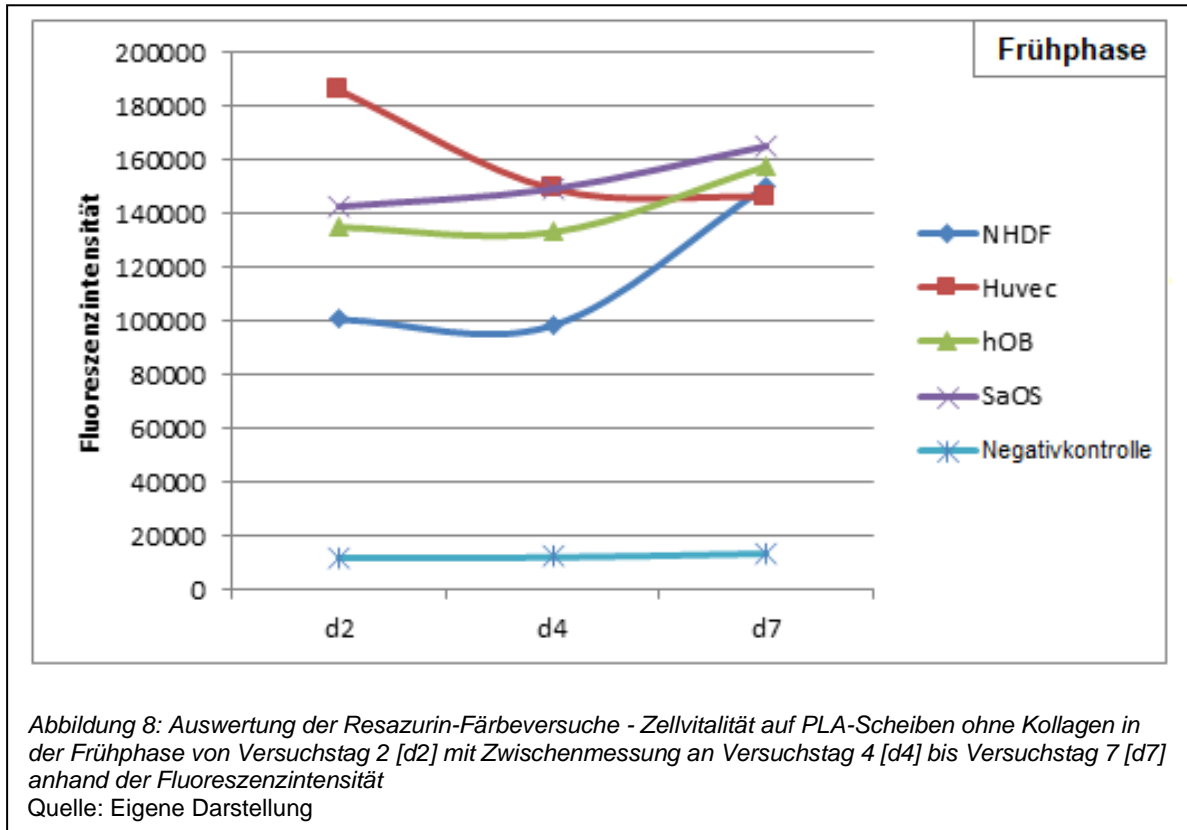
Die durch die Virustransduktion der Zellreihen erreichte Fluoreszenz sollte der späteren Darstellung unter dem Fluoreszenzmikroskop (EVOS) dienen. Mit Hilfe von diesem war eine Tiefenfokussierung auch im dreidimensionalen Käfigmodell möglich, was wiederum eine umfassende Beurteilung des Adhäsions- und Proliferationsverhaltens der Zellen ermöglichte. Darüber hinaus konnte die Interaktion von Zellen in der Cokultur beobachtet werden. Die Differenzierung der Reihen gelang hier durch die Transduktion der unterschiedlichen Farbfluoreszenzgene mCherry (kirschrot) und eGFP (grün).

4.4 Zellvitalitätsprüfung bei Anzucht auf PLA Modellen

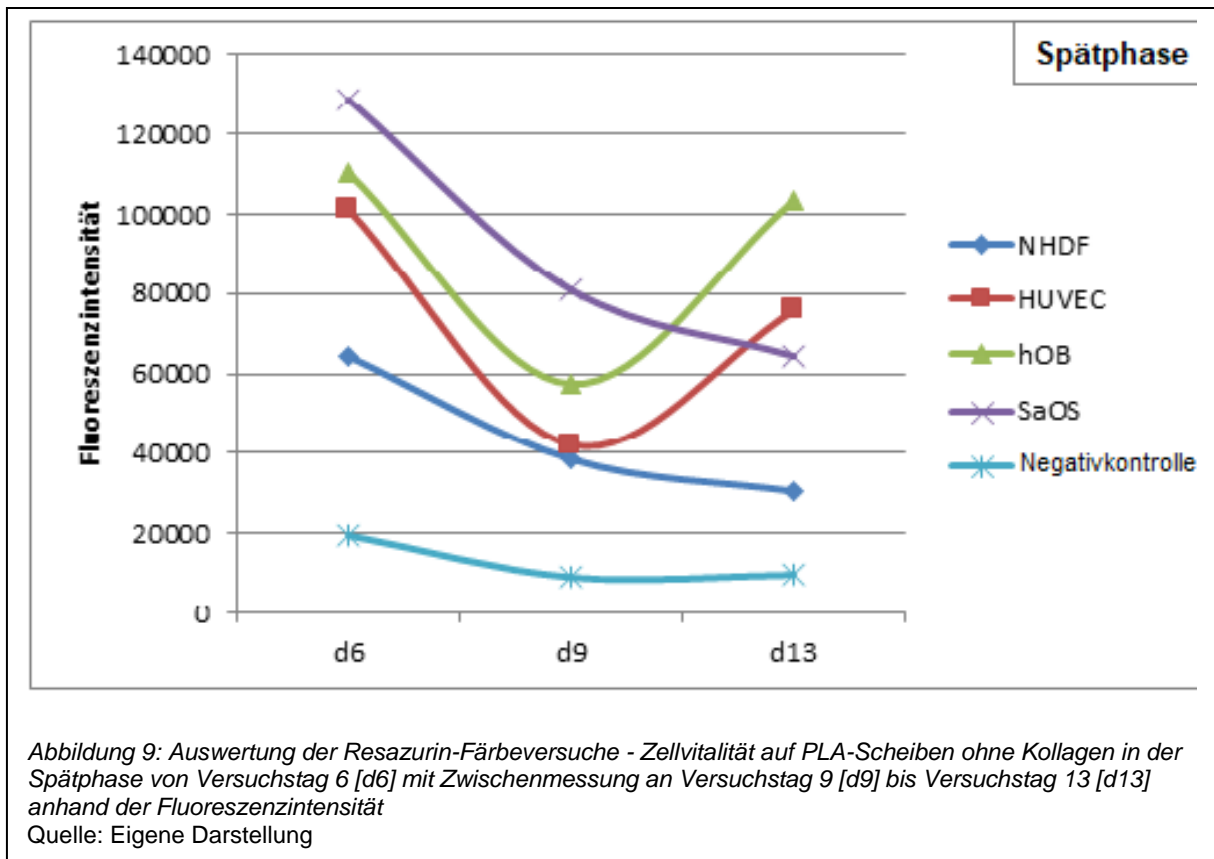
Die Zellvitalität der vier auf den PLA-Modellen gesäten Zellreihen wurde mittels Resazurin-Färbung geprüft. Die quantifizierte Umsetzung des blauen Farbstoffs Resazurin zu dem rosa Metabolit Resorufin wurde mittels Absorptionsmessung bestimmt und über die Beobachtungsperiode graphisch aufgezeigt.

4.4.1 PLA-Scheiben ohne Kollagenmantel

Es wurden zunächst die PLA-Scheibenmodelle ohne Kollagenüberzug analysiert.



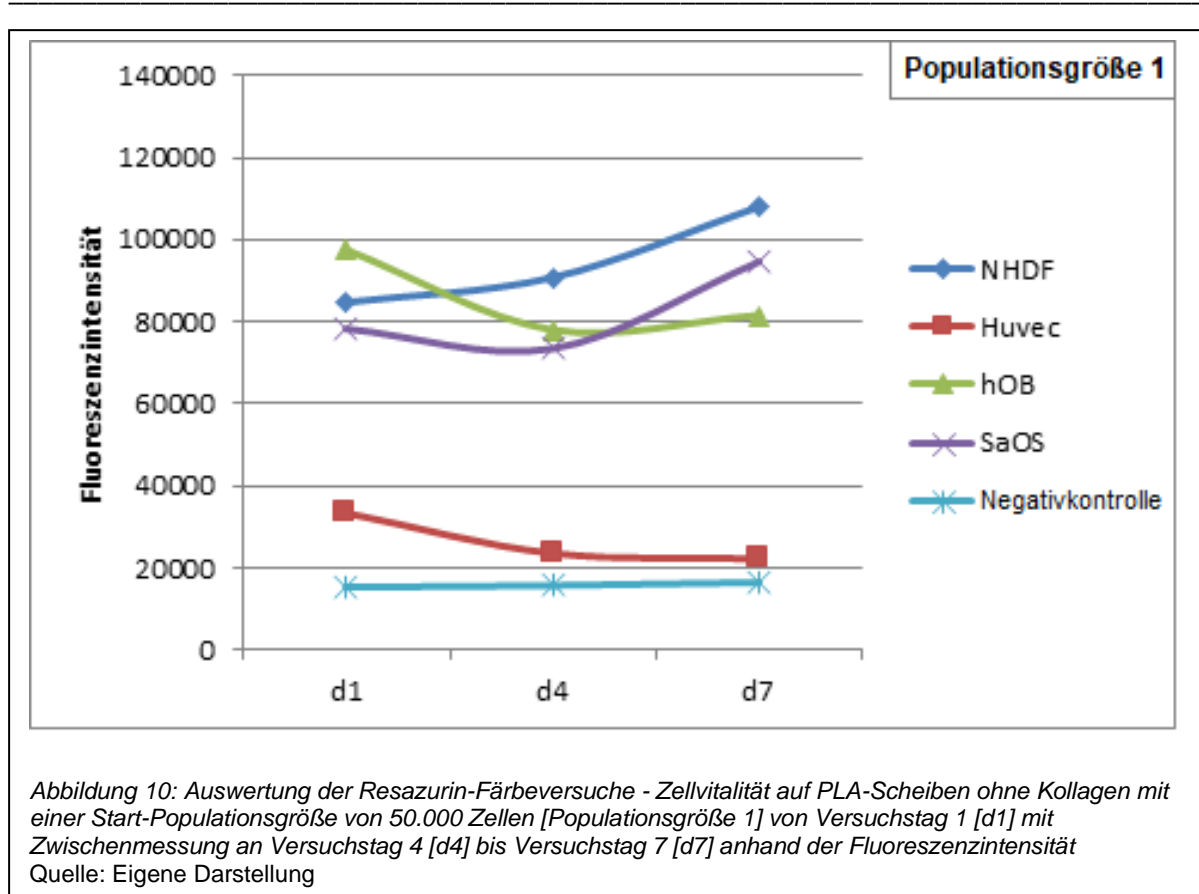
In Abbildung 8 wurde die Zellvitalität über zunächst eine Frühphase nach Aussaat bis zum siebten Tag nach Versuchsbeginn aufgezeigt. Es zeigte sich eine initial annähernd konstante Zellvitalität bis zur Messung am vierten Tag. Vom vierten bis siebten Tag zeigte sich eine erhöhte Zellvitalität, welche auf eine Zellproliferation in vitro schließen ließ. Eine Ausnahme bildeten bei diesen Beobachtungen die Endothelzellen der HUVEC Reihe. Diese zeigte zunächst einen Rückgang der Zellvitalität und stabilisierte sich dann annähernd.



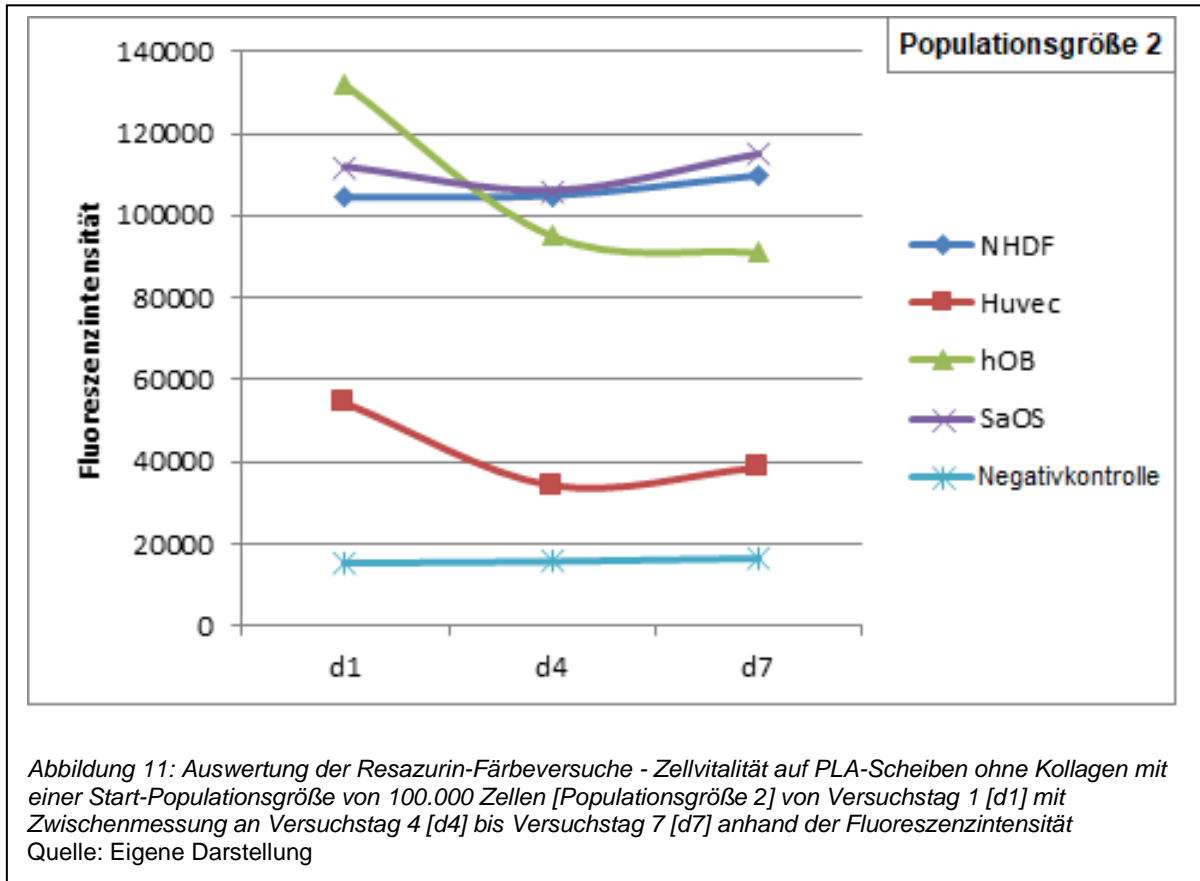
Weiterhin wurde in Abbildung 9 die Spätphase in der Entwicklung der auf PLA gesäten Zellen dargestellt. Hierbei wurde eine Zeitspanne vom sechsten bis zum dreizehnten Tag nach Aussaat analysiert. Diese zeigte eine Reduktion der vitalen Zellpopulation bis zum neunten Tag mit anschließender teilkompensatorischer Phase. Bei der hOB Zellreihe kam es hier zu einer nahezu vollständigen Kompensation, bei der HUVEC Reihe nur zu einer teilweisen. In den Darstellungen der Zellvitalität von NhDF und SaOS ließ sich lediglich ein verlangsamter Rückgang der vitalen Zellpopulation erkennen.

4.4.2 PLA-Scheiben ohne Kollagenmantel mit divergierenden initialen Populationsgrößen

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der jeweils ausgesäten Zellzahl untersucht. Hierzu wurden die PLA-Scheiben mit jeweils 50.000 und 100.000 Zellen der entsprechenden Zellreihen besetzt.



In der in Abbildung 10 visualisierten Darstellung der Zellvitalität bis zum siebten Tag nach Aussaat war bei zu Beginn divergierender Populationsgröße ein ähnlicher Proliferationsverlauf zu beobachten. So zeigten lediglich die Zellen der NhDF Reihe eine durchgehend zunehmende Vitalität. Die Populationen der hOB, SaOS und HUVEC zeigten einen Einbruch der Zellvitalität bis zum vierten Tag. Von diesem begannen sich SaOS und hOB anschließend zu erholen, da die vitale Population im Fall der SaOS wieder anwuchs und sich im Fall der hOB stabilisierte. Die HUVEC Reihe zeigte die initial geringsten Vitalitätsraten und eine deutliche Reduktion der vitalen Zellpopulation über den gesamten Zeitraum mit nur geringfügiger Kompensation vom vierten bis siebten Tag.

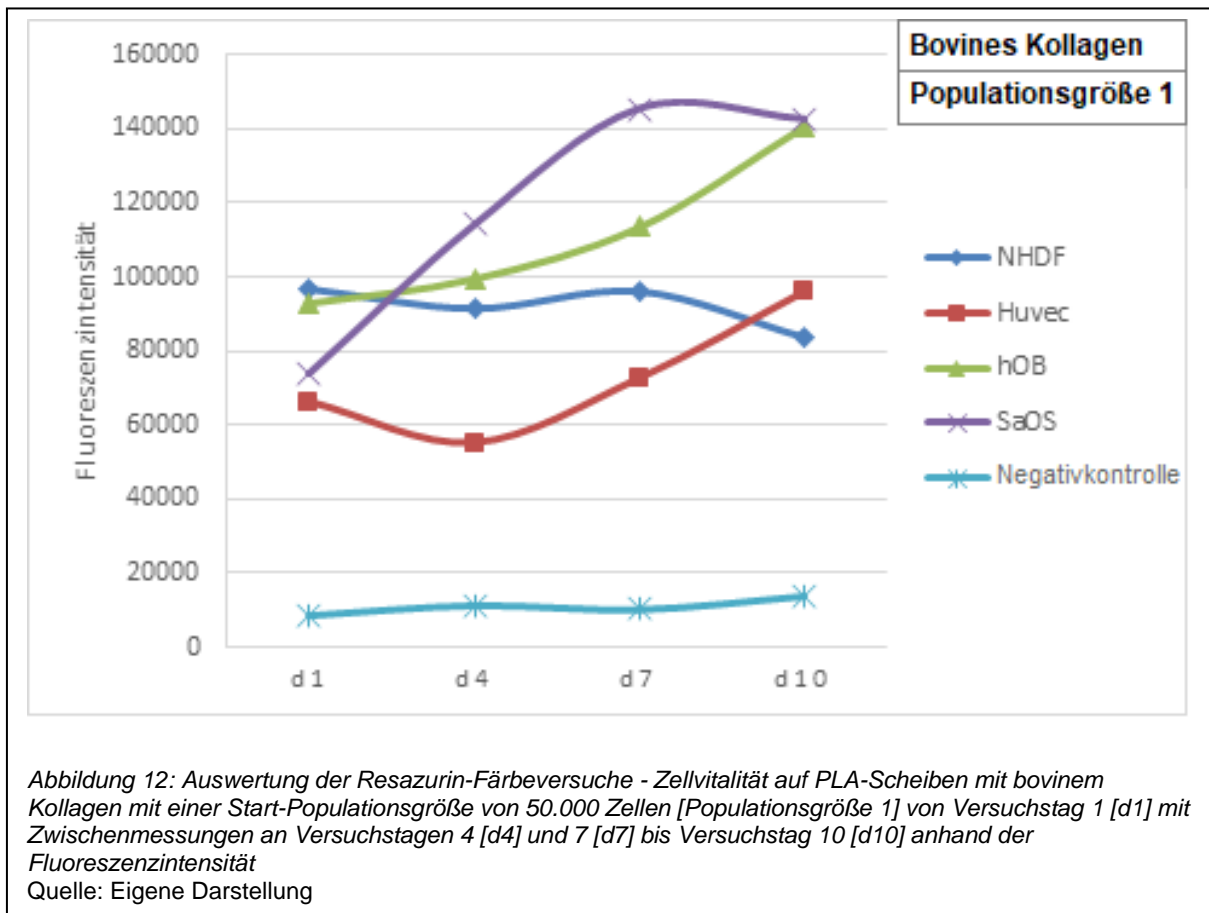


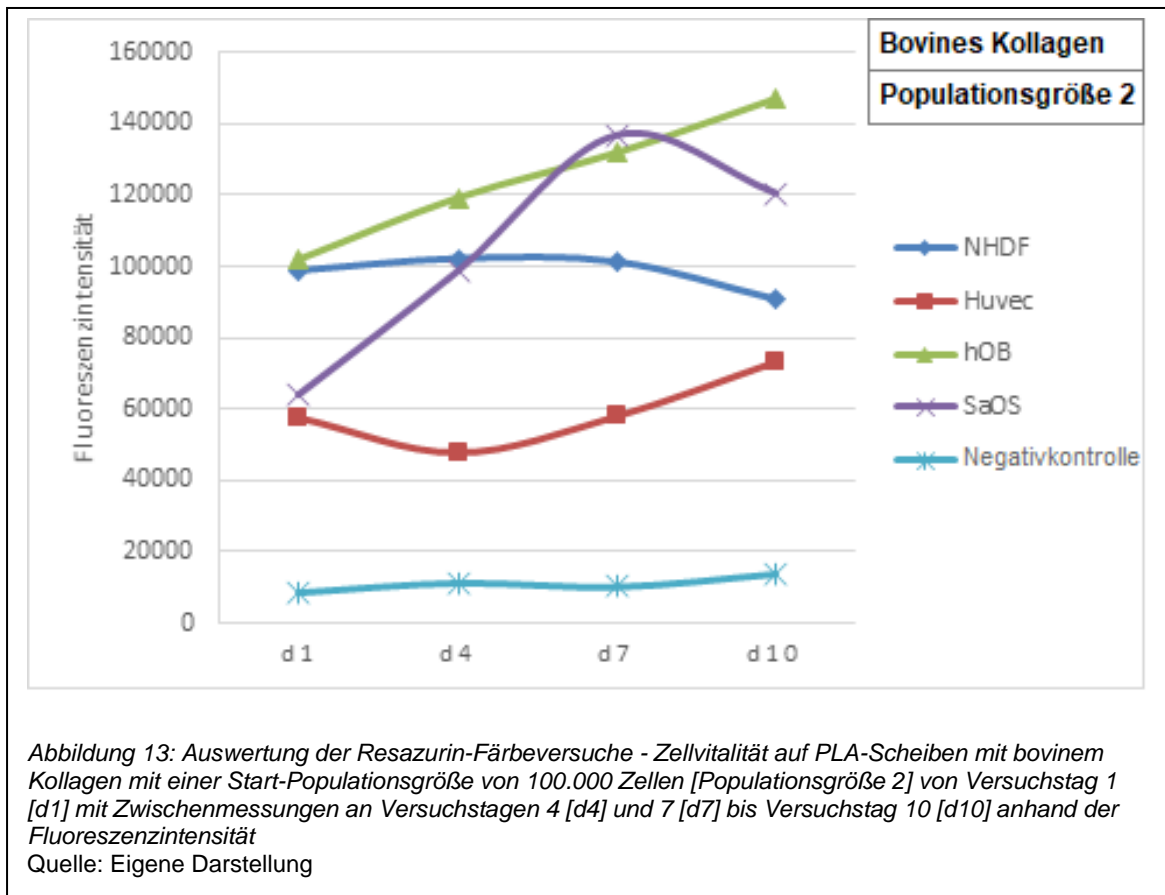
Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, war diese Kompensation der Populationsgröße bei vermehrter Aussaat wie im PLA-Modell mit 100.000 Zellen pro Reihe stärker ausgeprägt. Im Gegensatz hierzu fiel die Reduktion der Vitalität der hOB bei größerer Zellpopulation deutlicher und ihre Kompensation weniger ausgeprägt aus. Die Vitalitätsschwankungen schienen bei den anderen beiden Zellreihen, den NhDF und SaOS, im Versuch mit 100.000 Zellen geringer auszufallen.

Insgesamt kann von einer gleichartigen Entwicklung der Größe der vitalen Populationen gesprochen werden, wobei keine der Zellreihen durch eine Mehr-Aussaat akut negativ oder positiv beeinflusst wurde. In der Detailansicht war mit Ausnahme der hOB eher von einem positiven Einfluss größerer initialer Zellpopulationen auf die Populationsdynamik auszugehen.

4.4.3 PLA-Scheiben mit bovinem und Rattenschwanz Kollagenmantel mit divergierenden initialen Populationsgrößen

Zuletzt erfolgte die Messung der Zellvitalität der vier Zellreihen nach Aussaat auf mit Kollagen überzogenen PLA-Scheiben. Es wurden Versuchsreihen sowohl mit auf bovinem als auch auf Rattenschwanzkollagen gesäten Zellen angesetzt. Hierbei wurde zusätzlich erneut zwischen einer initialen Populationsgröße von 50.000 und 100.000 Zellen pro Reihe unterschieden.





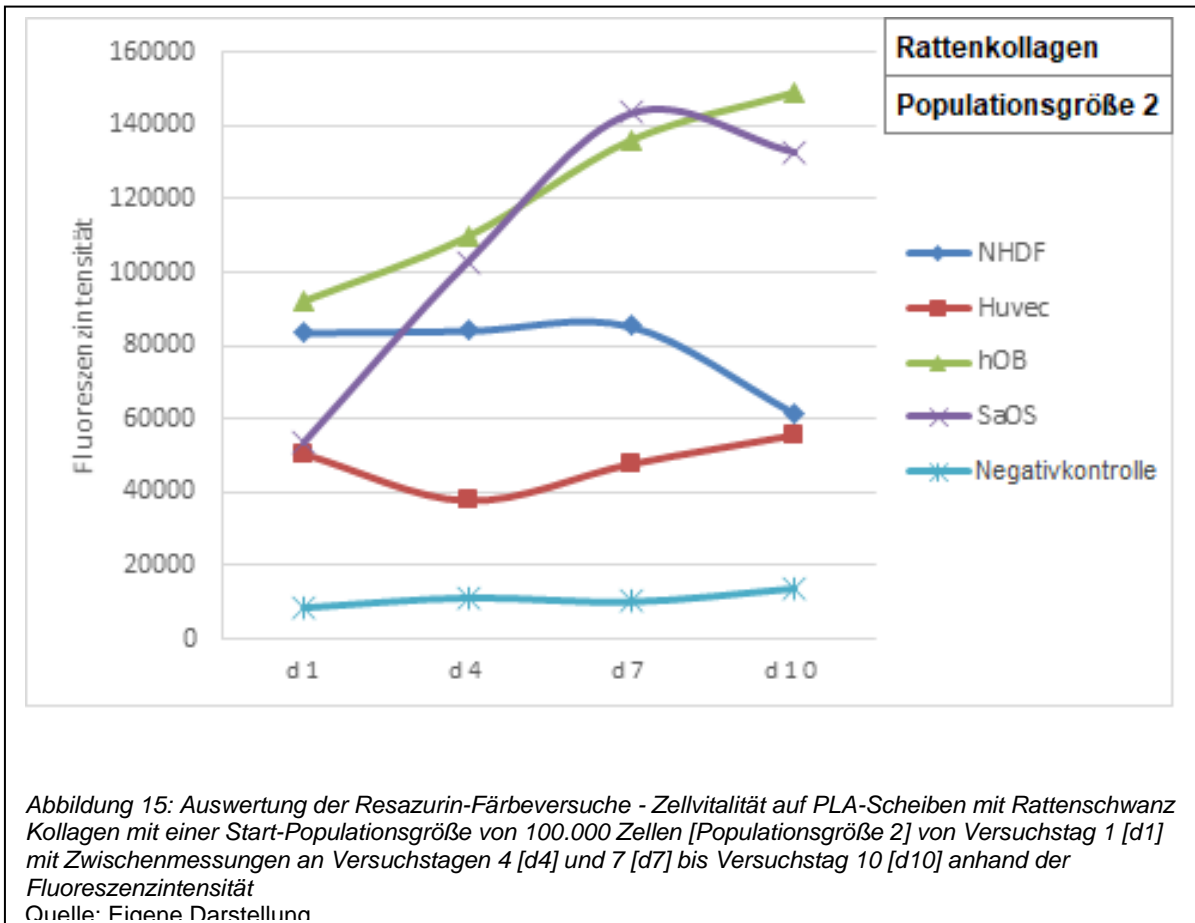
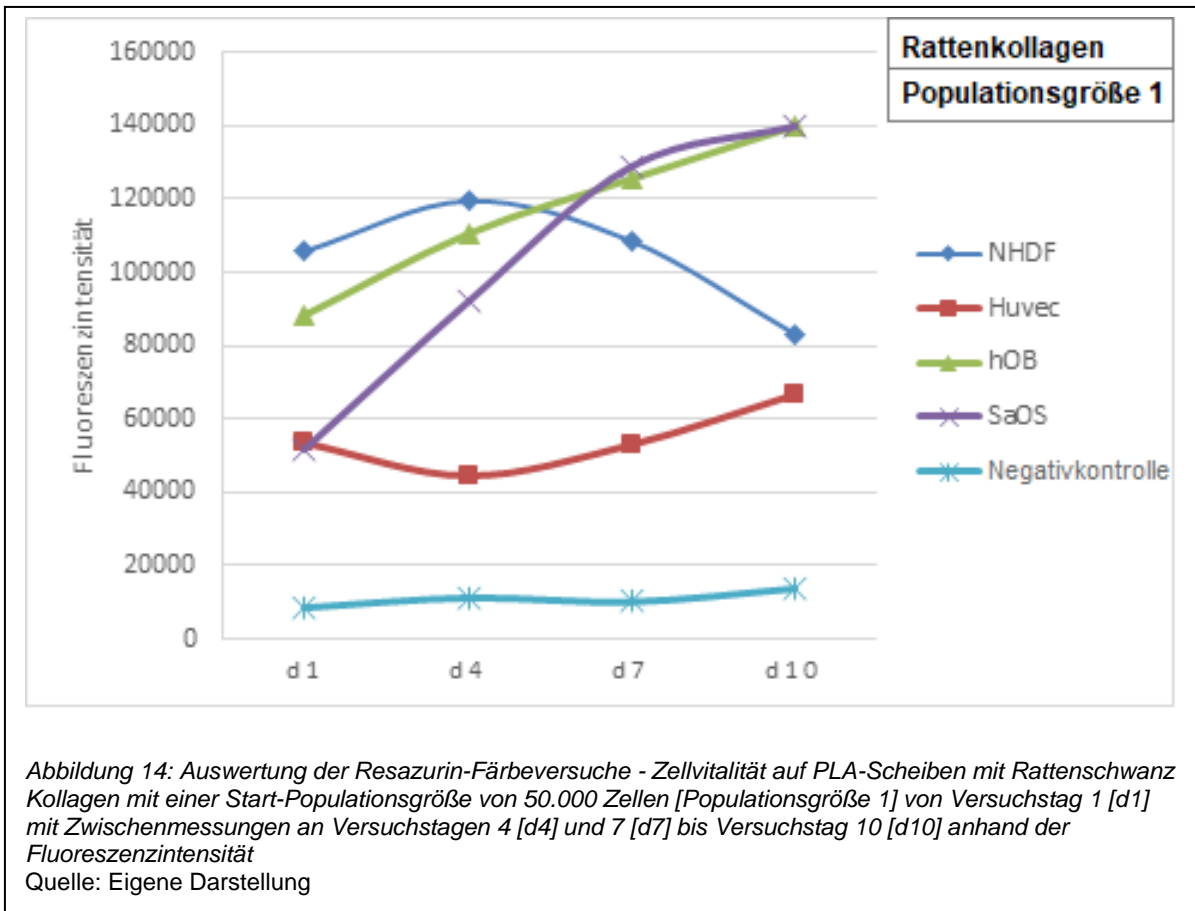
Der graphisch in Abbildung 12 und 13 dargestellte Vergleich zeigte das bekannte ähnliche Verhalten der Populationsdynamik innerhalb der Zellreihen bei zu Beginn divergierender Populationsgröße.

Es zeigte sich insgesamt eine verbesserte Zellvitalität aller vier Zellreihen bei vorhandenem Kollagenmantel verglichen mit den kollagenfreien Modellen (vgl. Abb. 10, Abb. 11).

Insbesondere die hOB Reihe zeigte eine durchgängig positive Entwicklung der Kultur.

Ebenso konnte in der SaOS Reihe eine akzelerierte Proliferation dargestellt werden, welche erst nach einer Versuchslaufzeit von einer Woche abflachte. Auch die HUVEC Reihe zeigte eine angehobene Proliferationsrate, welche weniger deutlich als im Fall der SaOS ausgeprägt, jedoch ab dem vierten Versuchstag stetig zu verzeichnen war. Lediglich im Fall der NhDF zeigte sich kein wesentlicher Unterschied in der Populationsdynamik.

Bei der Betrachtung der PLA-Modelle mit bovinem Kollagenüberzug in Abbildungen 12 und 13 und Rattenschwanz Kollagenüberzug in Abbildung 14 und 15 fielen jedoch Abweichungen auf.



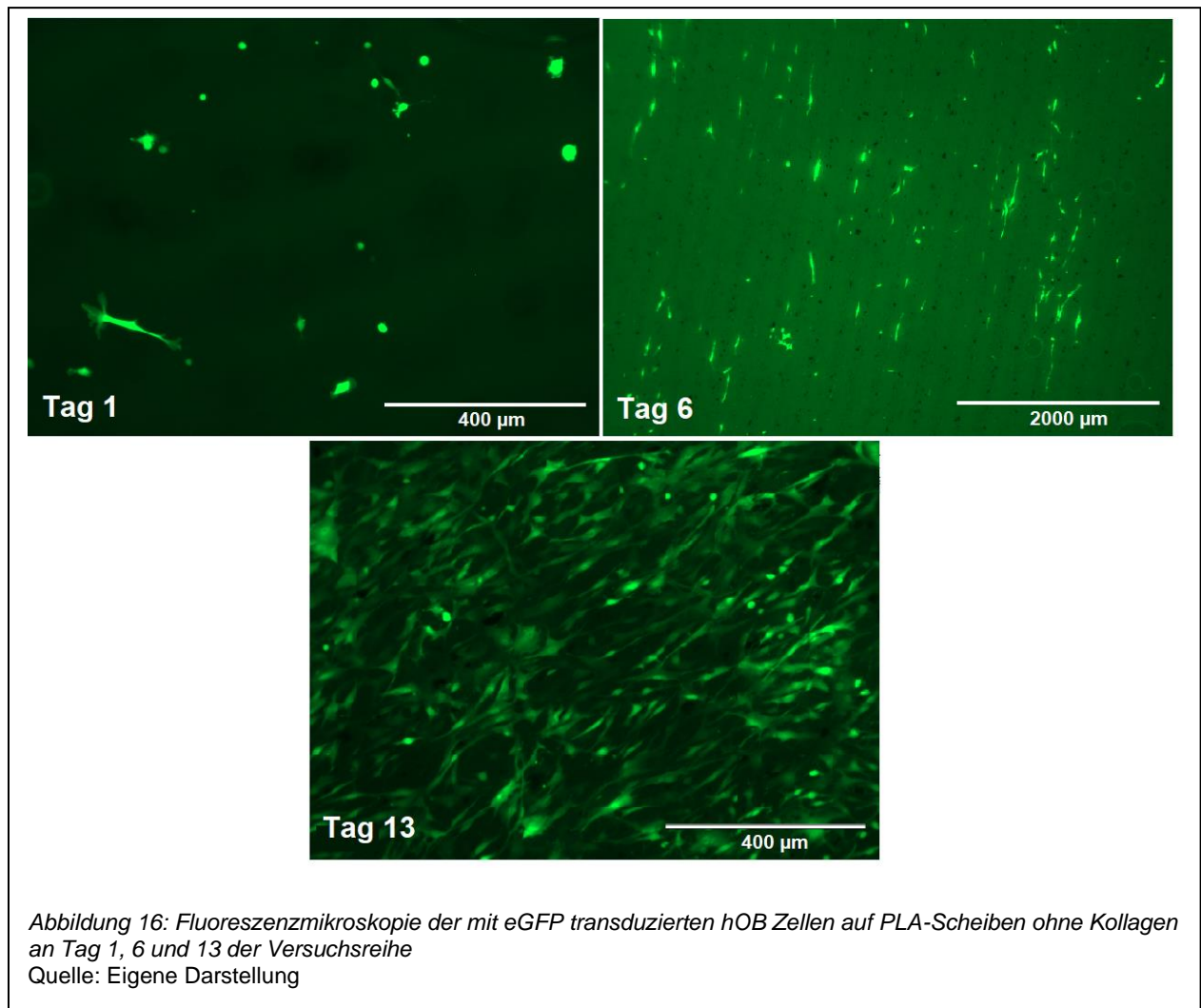
Es war zu verzeichnen, dass die Raten der Vitalität aller Zellreihen auf dem bovinen Kollagen (vgl. Abb. 12, Abb.13) höher als auf den mit Rattenschwanz Kollagen überzogenen ausfielen, welche in Abbildung 14 und 15 dargestellt sind. Dies zeigte sowohl die Versuchsreihe mit 50.000 als auch mit 100.000 Zellen. Die HUVEC Zellen entwickelten sich entgegen den Erwartungen bei kleinerer initialer Populationsgröße besser. Die anderen Zellreihen zeigten bei größerer Startkultur geringfügig angehobene Vitalitätsraten.

4.5 Verhalten in der Fluoreszenzmikroskopie

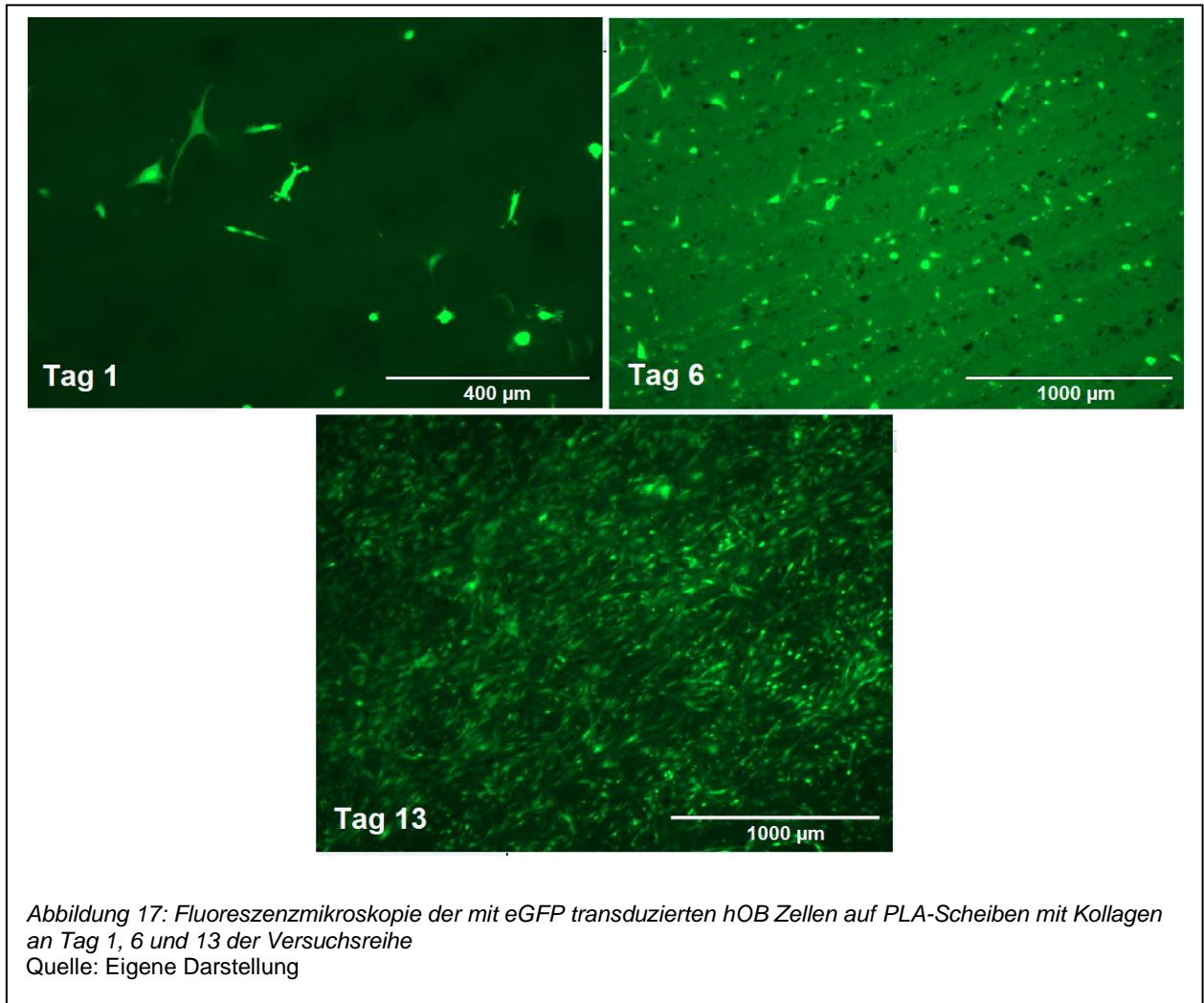
4.5.1 PLA-Scheiben mit und ohne Kollagenmantel

Die Zellen der vier Reihen wurden auf den 3D-gedruckten PLA-Scheiben ausgesät und ihr Kulturverhalten durch Fluoreszenzmikroskopie abgebildet. Dies diente der visuellen Auswertung der Zellverhaltens bei Anzucht auf PLA und schließlich dem Vergleich mit von Kollagen ummantelten PLA-Scheiben. Es wurde hierzu bovines Kollagen herangezogen, da dieses in den Resazurin-Färbeversuchen die besseren Ergebnisse der Zellvitalität gezeigt hatte.

4.5.1.1 hOB Zellen auf PLA-Scheiben ohne und mit Kollagenmantel

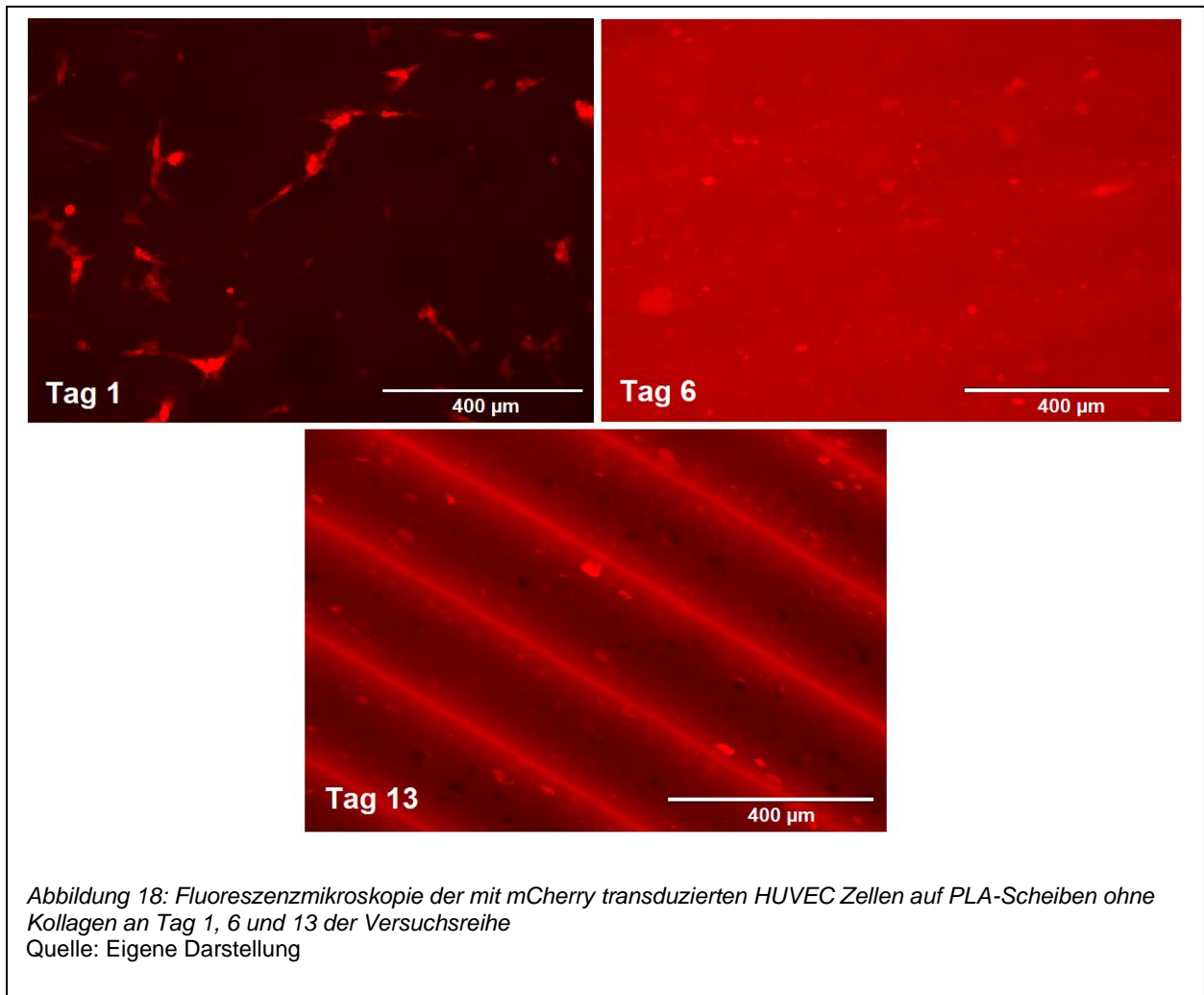


Die auf den PLA-Scheiben gesäten hOB zeigten über einen Zeitraum von 13 Tagen eine deutliche Proliferation mit zunehmender Adhäsion an den Scheiben wie in Abbildung 16 nachzuvollziehen. Hier schienen vor allem die durch den 3D-Druck resultierenden Rillenstrukturen eine Adhäsion zu unterstützen [Tag 6]. Entlang dieser Furchen im PLA zeigten sich auch zunehmend ausgebildete Pseudopodien, welche teils zur Konfluenz der Kultur führten, während die Flächen zwischen den Furchen tendenziell mit geringeren Zellzahlen besiedelt waren [Tag 13].



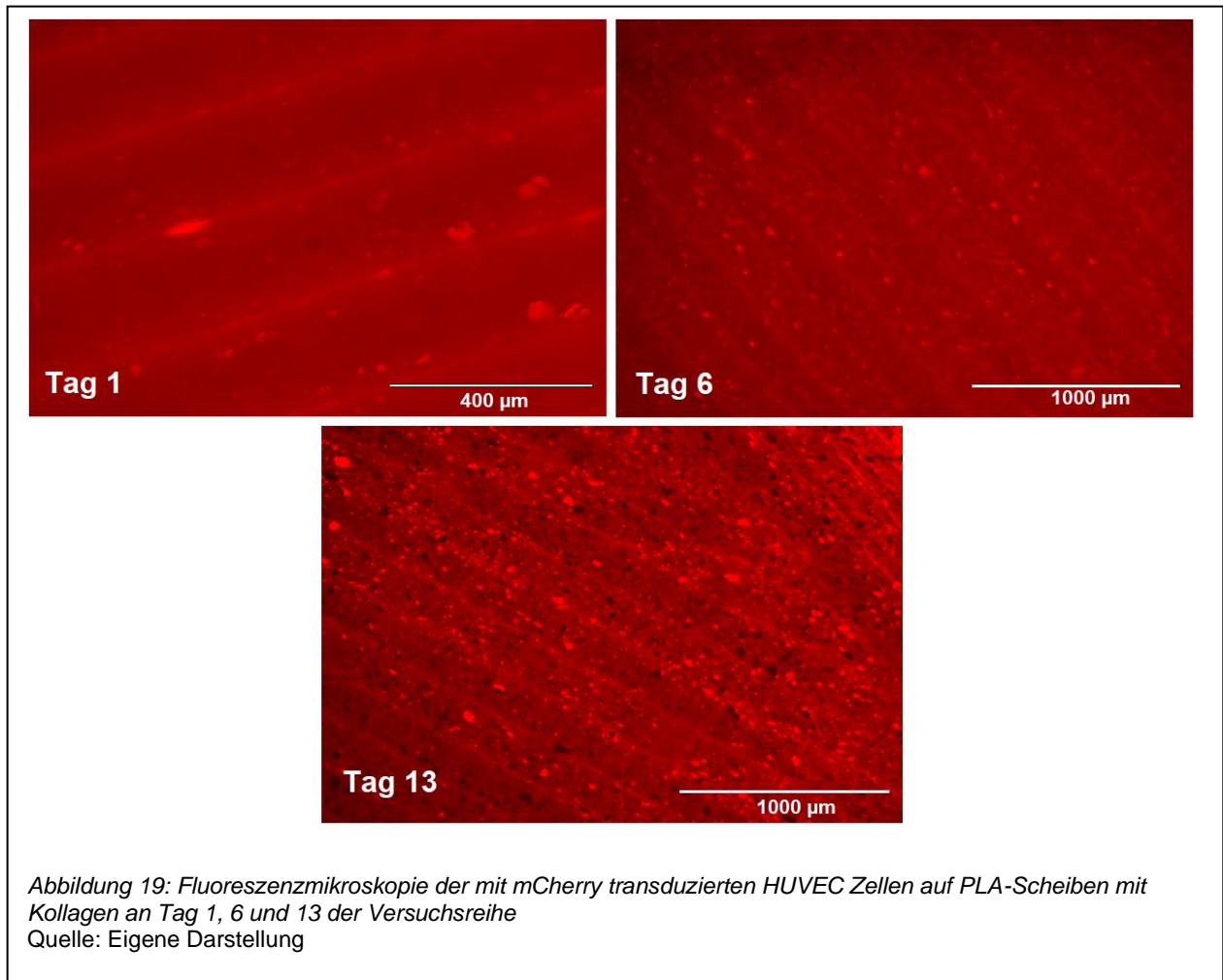
Im in Abbildung 17 abgebildeten PLA-Scheibenmodell mit Kollagenüberzug zeigte sich eine insgesamt verbesserte Proliferation und Adhäsion aller vier Zellreihen. So konnte im Fall der hOB eine frühzeitige Adhäsion mit vermehrter Ausbildung von Pseudopodien beobachtet werden [Tag 1]. Auch die Konzentration auf und Ausrichtung innerhalb der Mikrorillen konnte nur noch im geringeren Maße beobachtet werden [Tag 6]. Stattdessen kam es zu Anhaftungen der Zellen im Bereich des gesamten Scheibenmodells [Tag 13].

4.5.1.2 HUVEC Zellen auf PLA-Scheiben ohne und mit Kollagenmantel



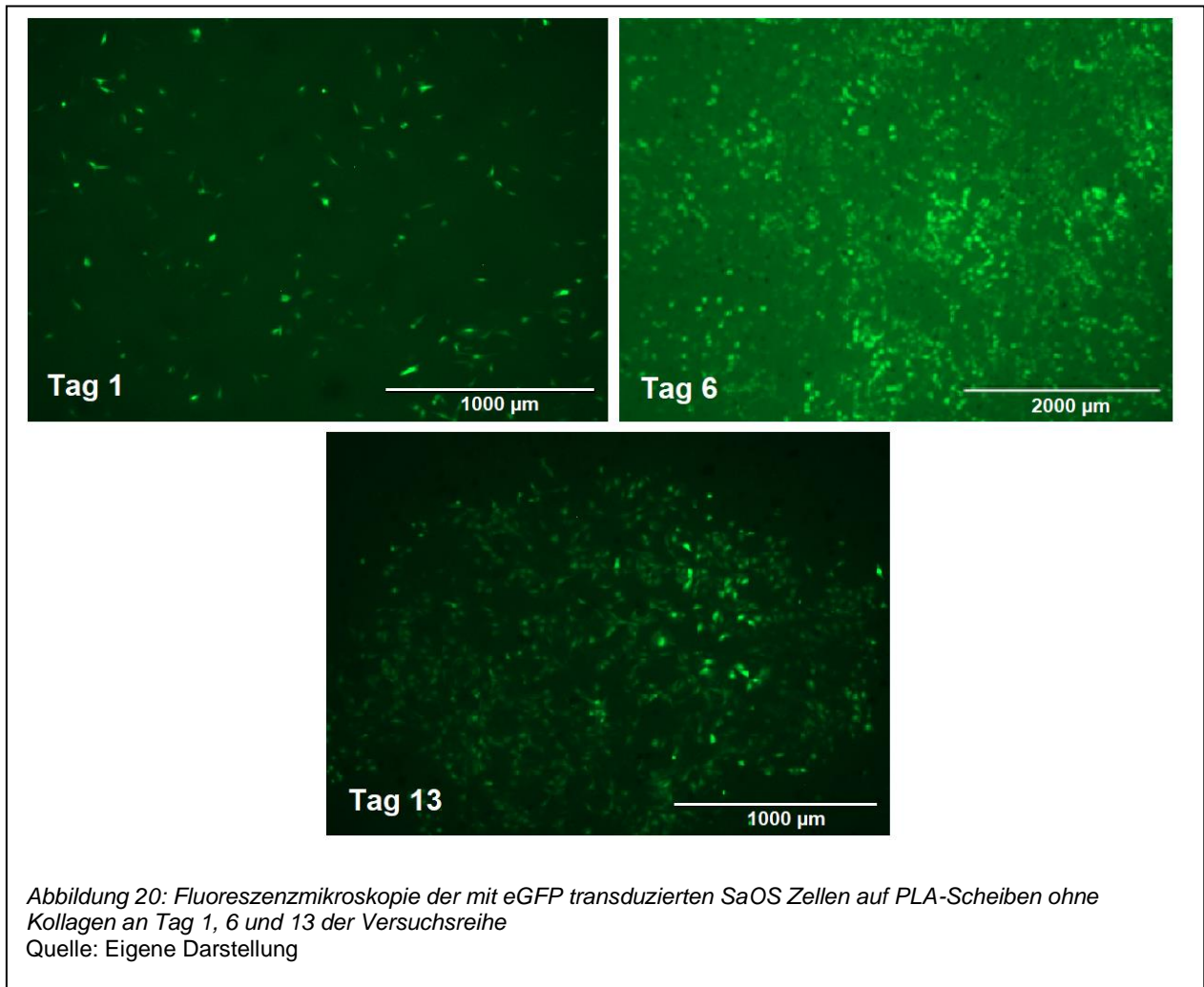
Ein ähnliches Verhalten zeigte sich auch im Fall der HUVEC dargestellt in Abbildung 18, welche jedoch auf den kollagenfreien PLA-Scheiben nur erschwert adhären wurden. Sie zeigen zunächst eine Adhäsionstendenzen [Tag 1], welche über die Zeit jedoch wesentlich abzunehmen schien [Tag 6]. Eine Konfluenz konnte nicht beobachtet werden [Tag 13].

Sowohl die Zellen der hOB als auch der HUVEC Reihe zeigten in ihrer Positionierung eine deutliche Ausrichtung entlang der Mikrorillenstrukturen der PLA-Flächen.

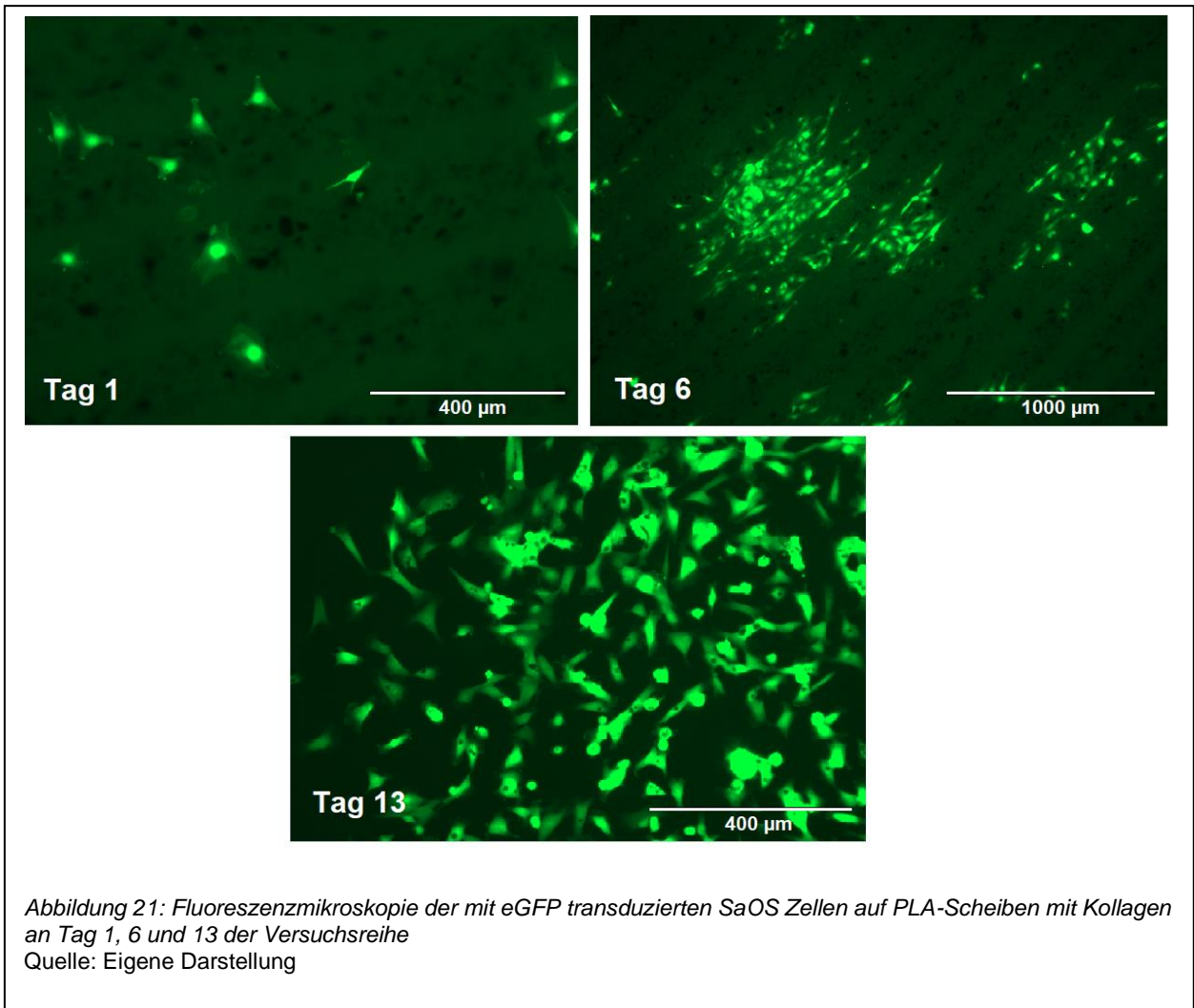


Die Zellen der HUVEC Reihe zeigten nach Kollagenummantelung der PLA-Scheiben, dargestellt in Abbildung 19, ebenfalls eine verbesserte Proliferation [Tag 6] jedoch weiterhin ohne maßgeblich vermehrte Ausbildung von Pseudopodien oder Konfluenz [Tag 13]. Die Adhärenz zu den Mikrorillen der PLA-Scheiben blieb in der HUVEC Kultur auch im Kollagen teilweise erhalten.

4.5.1.3 SaOS Zellen auf PLA-Scheiben ohne und mit Kollagenmantel

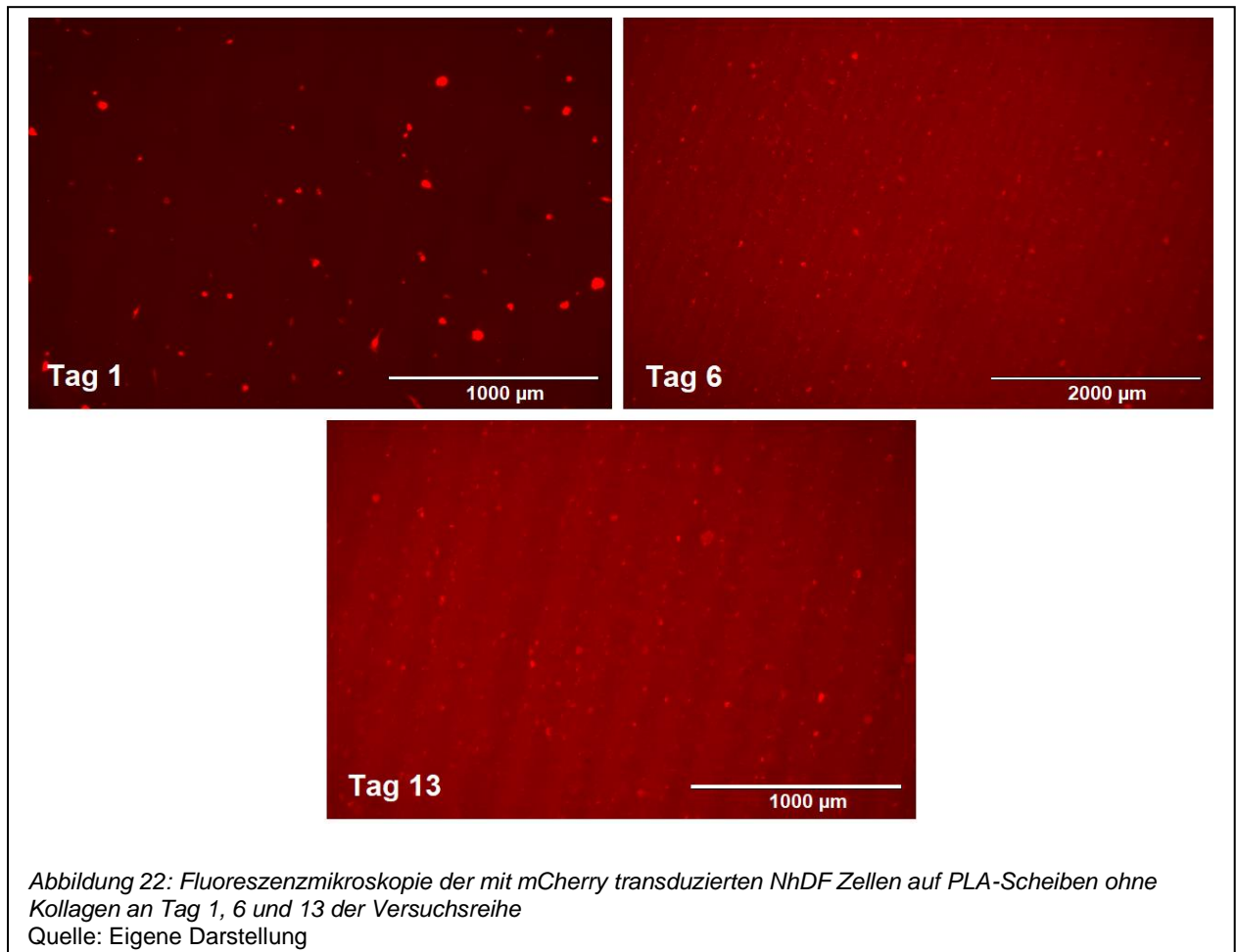


Die bei weitem beste visuelle Proliferation und Adhäsion im kollagenfreien PLA-Scheibenmodell zeigten die Zellen der SaOS Reihe, welche in Abbildung 20 nachzuvollziehen ist. Hier kam es bereits nach weniger als einer Woche zu furchenübergreifender Konfluenz der Kultur mit nicht an die Mikrostruktur gebundener Ausrichtung [Tag 6]. Die Kultur limitierte sich im Folgenden selbst und blieb über den weiteren Beobachtungszeitraum konstant [Tag 13].

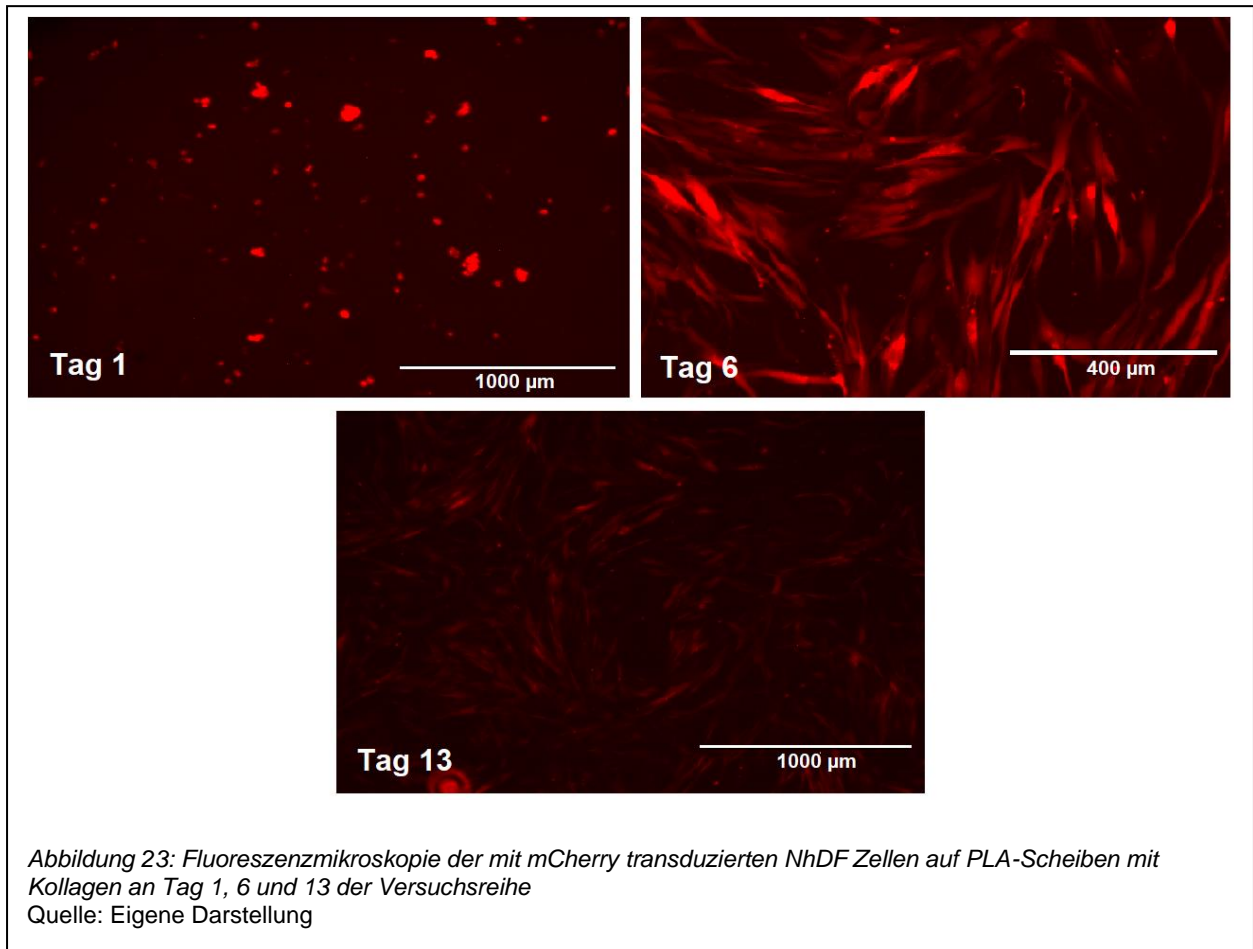


Den deutlichsten Unterschied im Kulturverhalten auf den kollagenüberzogenen PLA-Scheiben zeigten erneut die Zellen der SaOS Reihe, welche in Abbildung 21 zu sehen sind. Neben einer ausgeprägten Proliferation und Adhäsion bereits kurz nach der Aussaat [Tag 1] zeigte sich in der Konfluenz eine Makrostrukturbildung [Tag 6]. Diese konnte im Rahmen von mehrlagiger Zelladhäsion und Bildung von dreidimensionalen Geflechten in Clustern dargestellt werden [Tag 13], welche sich primär randständig auf den Scheibenmodellen lokalisieren ließen.

4.5.1.4 NhDF Zellen auf PLA-Scheiben ohne und mit Kollagenmantel



Die Zellen der NhDF Reihe proliferierten ebenfalls auf den kollagenfreien PLA-Scheiben wie in Abbildung 22 zu sehen, zeigten jedoch keine so deutliche Adhärenz im Bereich der Mikrostrukturen der Scheibenoberfläche [Tag 1]. Stattdessen kam es zu einer von der Mikrostruktur unabhängigen gleichmäßigen Zellverteilung [Tag 6, Tag 13]. Eine Konfluenz wurde nicht erreicht [Tag 13]. Insgesamt konnten weniger Adhäsionsreaktionen und nahezu keine Ausbildungen von Pseudopodien beobachtet werden.



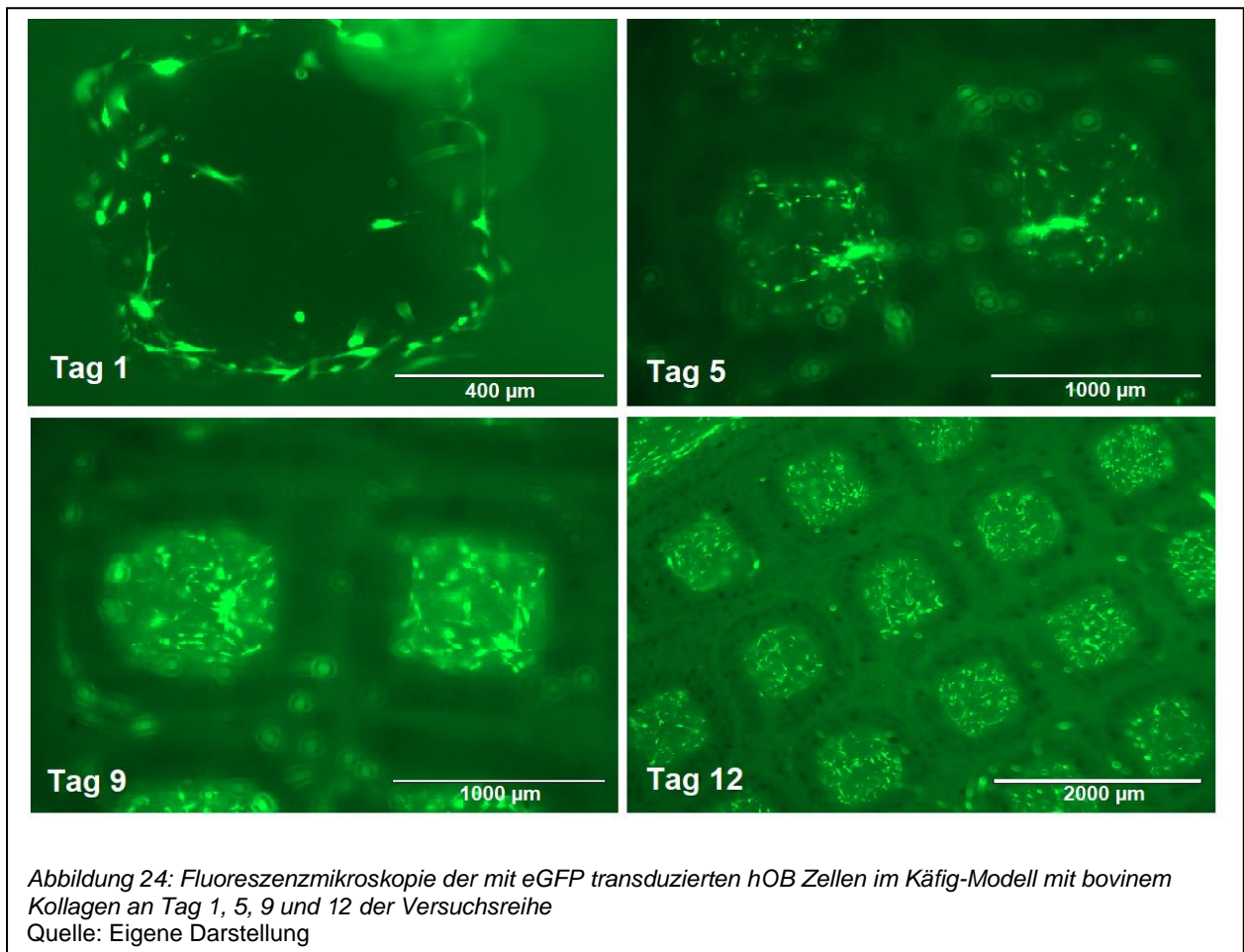
Die NhDF zeigten nach Kollagenummantelung wie in Abbildung 23 dargestellt eine visuell maßgeblich verbesserte Proliferation verglichen mit dem kollagenfreien Modell [Tag 1]. Das Zellinteraktionsverhalten war ebenfalls wesentlich verbessert und es wurde eine Konfluenz der Kultur erreicht, welche von der PLA Struktur unabhängig war [Tag 6]. Das Zellverhalten zeigte sich über die Dauer des Versuchs unverändert und die Kultur stabilisierte sich [Tag 13] ähnlich wie bei den SaOS Zellen beobachtet.

4.5.2 Kollagengefüllte PLA-Käfige

Im nächsten Schritt wurden die Käfig-Modelle mit bovinem und Rattenschwanz Kollagen gefüllt und die Ergebnisse der Kulturen für die vier Zellreihen verglichen.

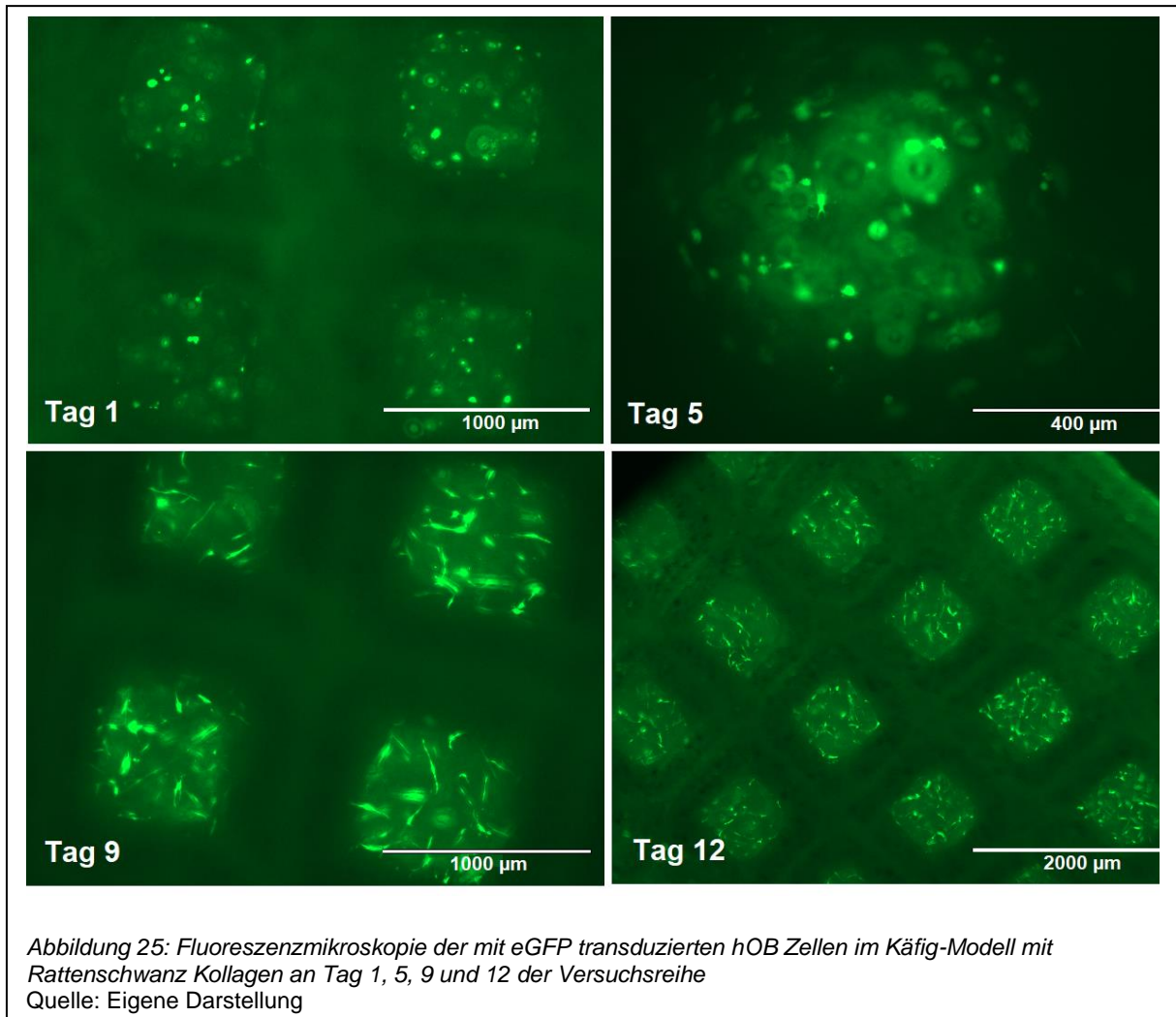
4.5.2.1 hOB in PLA-Käfigen mit bovinem und Rattenschwanz Kollagen

Bei der Anzucht im dreidimensionalen Käfig-Modell zeigte die hOB Zellreihe deutlich divergierende Wachstumsmuster in bovinem und Rattenschwanz Kollagen.



In mit bovinem Kollagengel gefüllten Käfigen, zu sehen in Abbildung 24, kam es zu einer zunächst randständigen Adhäsion [Tag 1], welche einer Auskleidung der porenartigen Gitterstrukturen gleichkam. Im weiteren Verlauf zeigte sich eine Zellproliferation mit zunehmend zu beobachtenden Zellkonglomeraten [Tag 5], welche über Adhäsionsbrücken

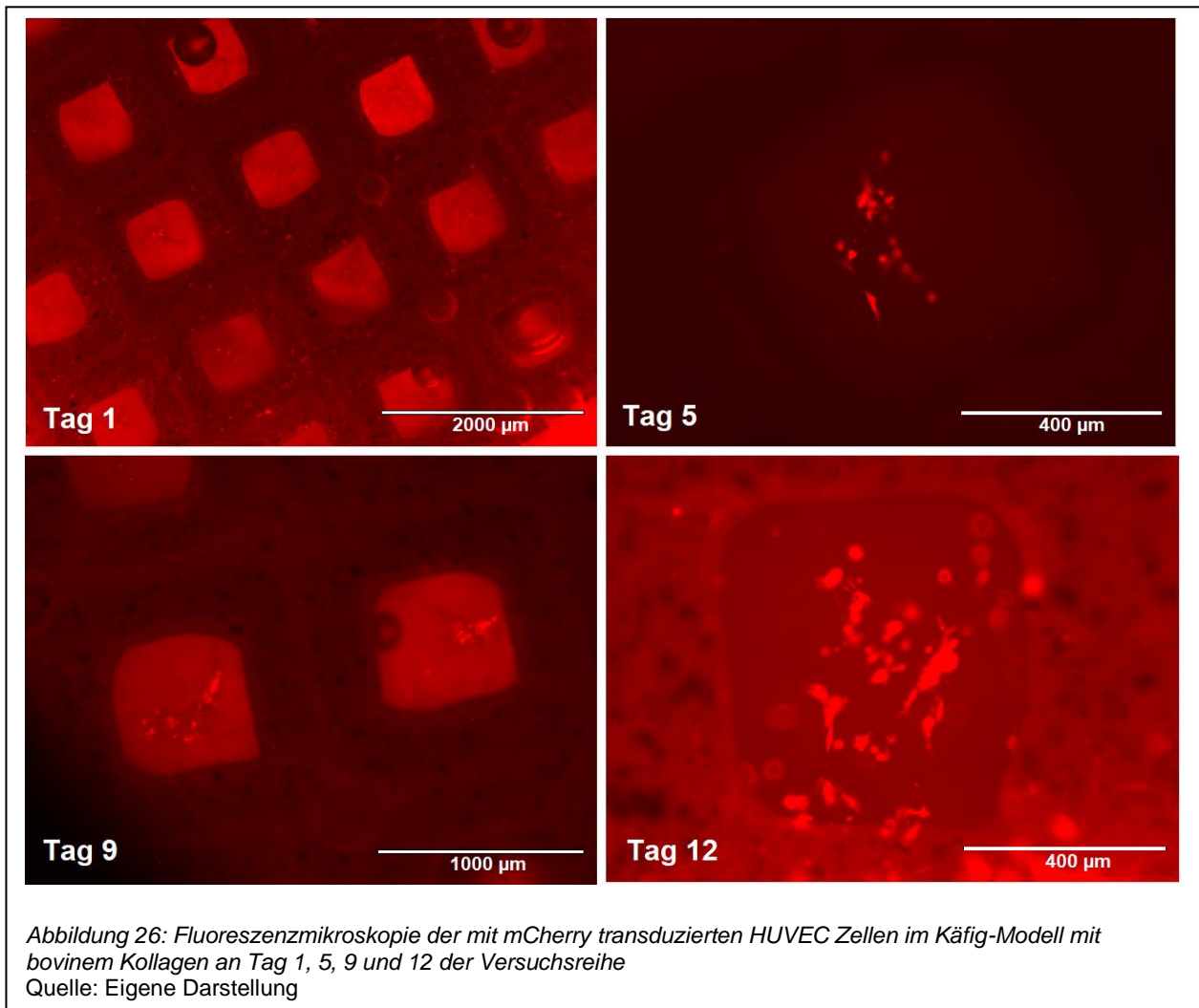
mittig der Poren gehalten wurden. Teils bildeten sich multiple Zellballen pro Pore welche diese gerüstartig durchspannten [Tag 9]. Schließlich zeigte sich eine gleichmäßige Durchsetzung des Porengitters [Tag 12].



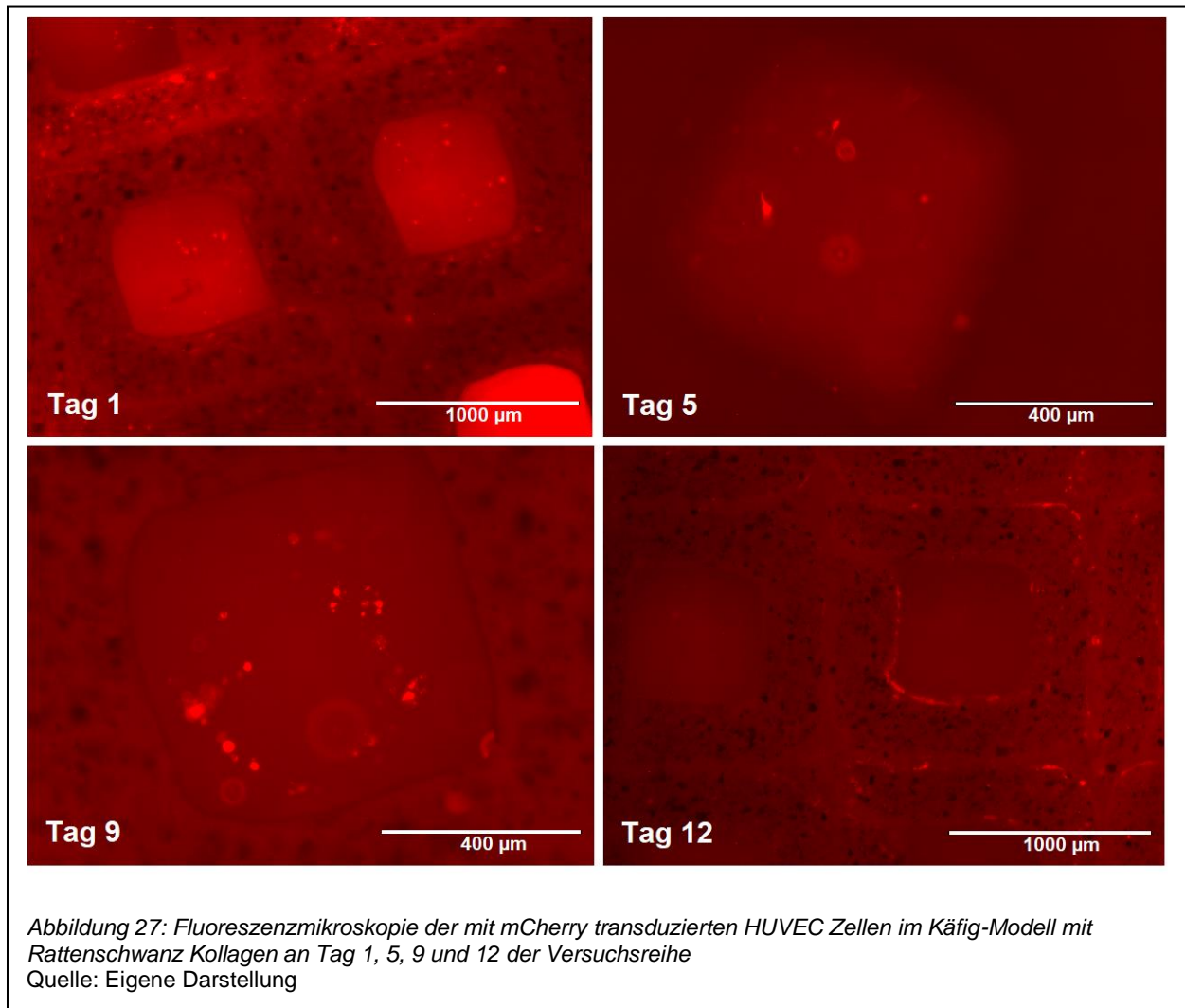
Nach Aussaat im Rattenschwanz Kollagen wie in Abbildung 25 zu sehen konnte ebenfalls eine Proliferation und Adhäsion an den Gitterstrukturen der Käfige beobachtet werden, welche jedoch später eintraten [Tag 9]. Die randständige Auskleidung der Poren und auch die beschriebene Bildung von Zellballungen blieben aus. Letztlich zeigte sich jedoch ebenfalls eine vollständige Durchsetzung des Modells mit hOB Zellen [Tag 12].

4.5.2.2 HUVEC in PLA-Käfigen mit bovinem und Rattenschwanz Kollagen

Auch in der zwölf-tägigen Beobachtungsperiode der in Käfigen immobilisierten HUVEC zeigten sich divergierende Wachstumsmuster zwischen den Modellen mit bovinem und Rattenschwanz Kollagen.

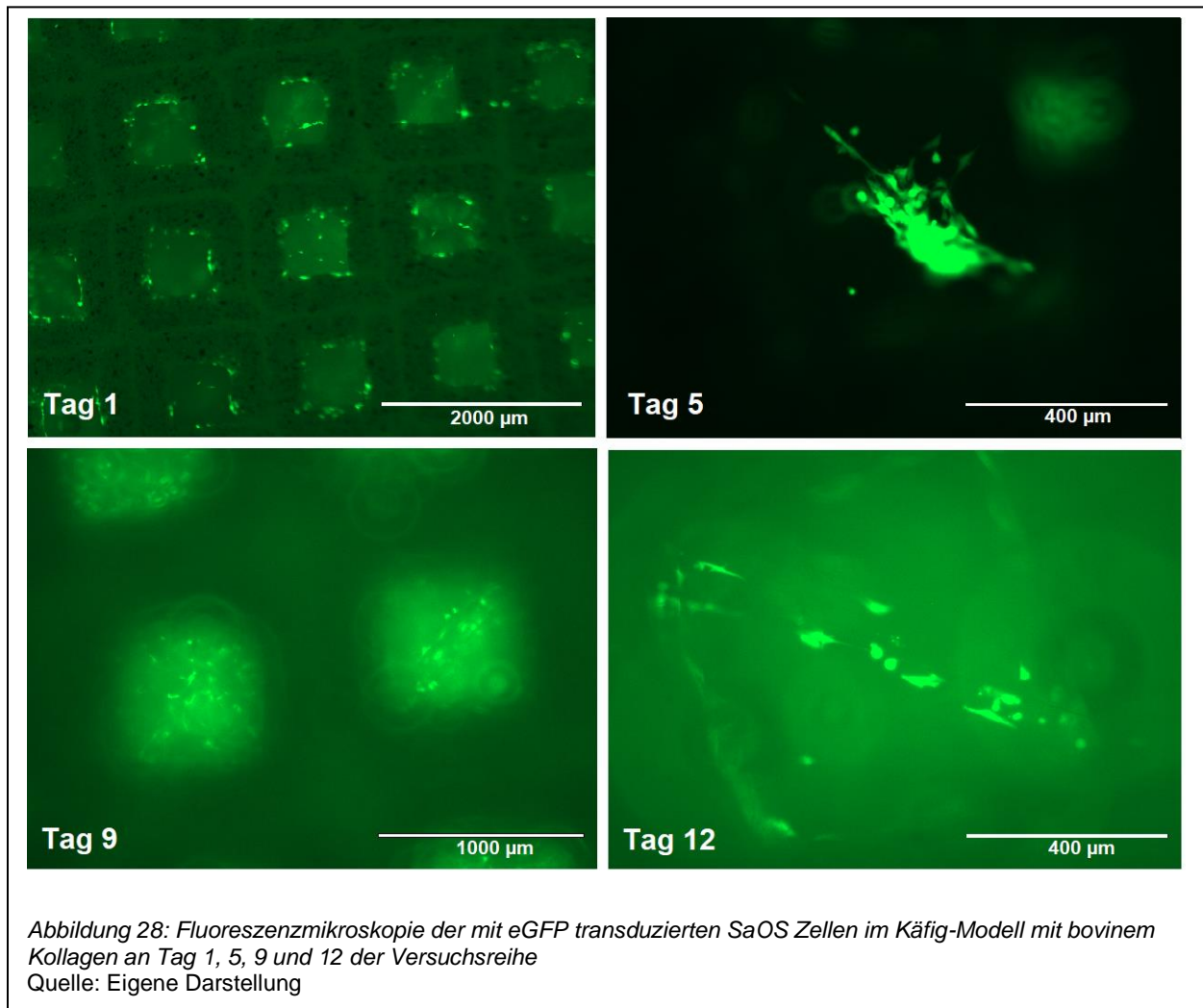


Die in Abbildung 26 zu sehenden, in bovinem Kollagen gesäten HUVEC proliferierten und adhärten im Vergleich zu den anderen drei Zellreihen eher langsam [Tag 1], bildeten im Verlauf jedoch komplexe dreidimensionale Strukturen [Tag 5], welche sich teils röhrenartig, das Käfiggitter durchspannend, im Sinne der möglichen Bildung von Gefäßstrukturen darstellten [Tag 12].

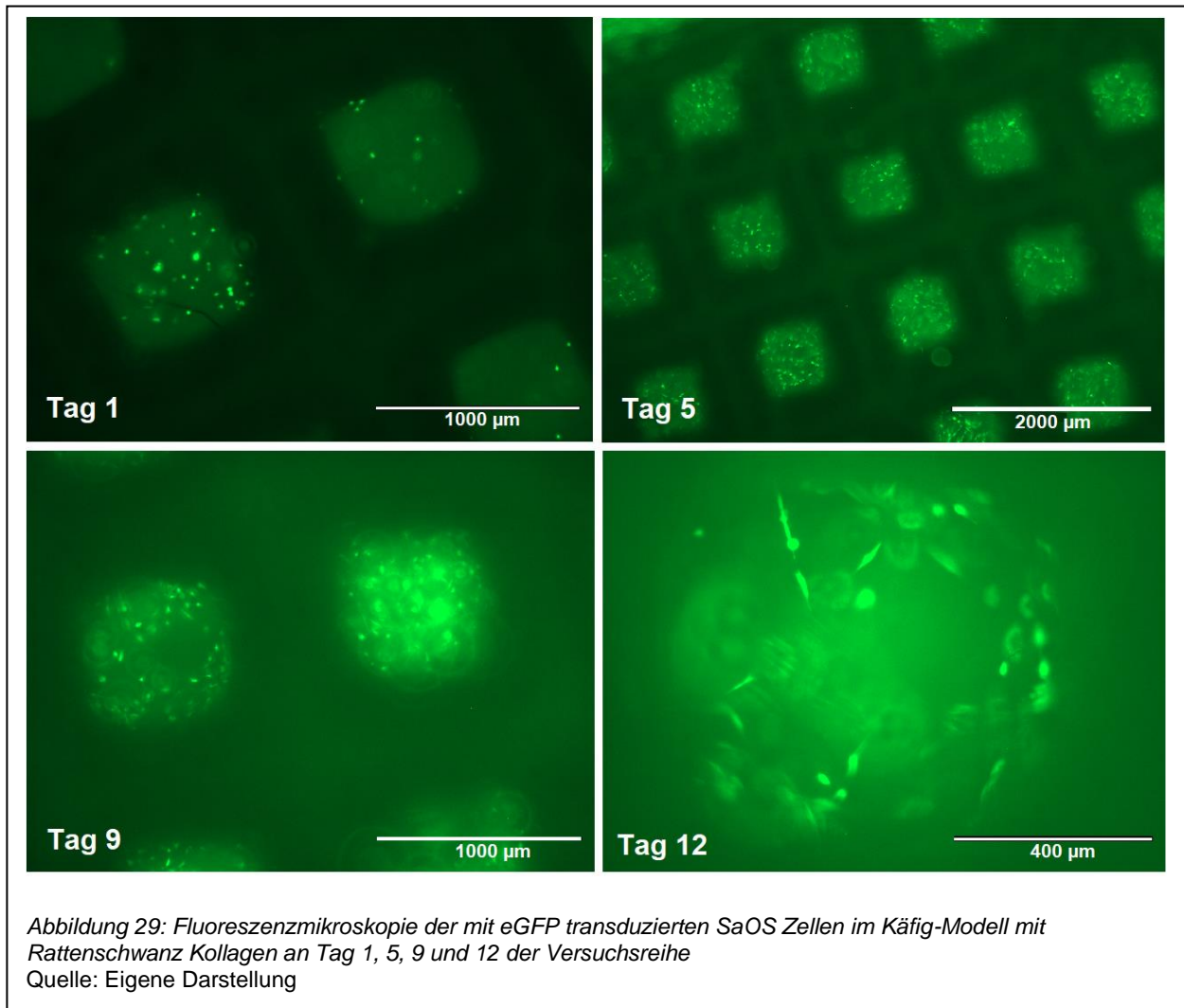


Im Rattenschwanz Kollagen, wie in Abbildung 27 abgebildet, konnten solche Komplexstrukturen nicht dargestellt werden. Es kam stattdessen teils in der Spätphase des Versuchs zur Auskleidung der Porenstruktur mit jedoch geringer Zellinteraktion und nur zögerlicher Ausbildung von Pseudopodien [Tag 9, Tag 12]. Weiterhin konnte eine Tendenz zur Zellansammlung auf den Käfigaußenseiten beobachtet werden, sodass es zum lokalisierten Zellüberzug des Käfiggerüsts kam.

4.5.2.3 SaOS in PLA-Käfigen mit bovinem und Rattenschwanz Kollagen

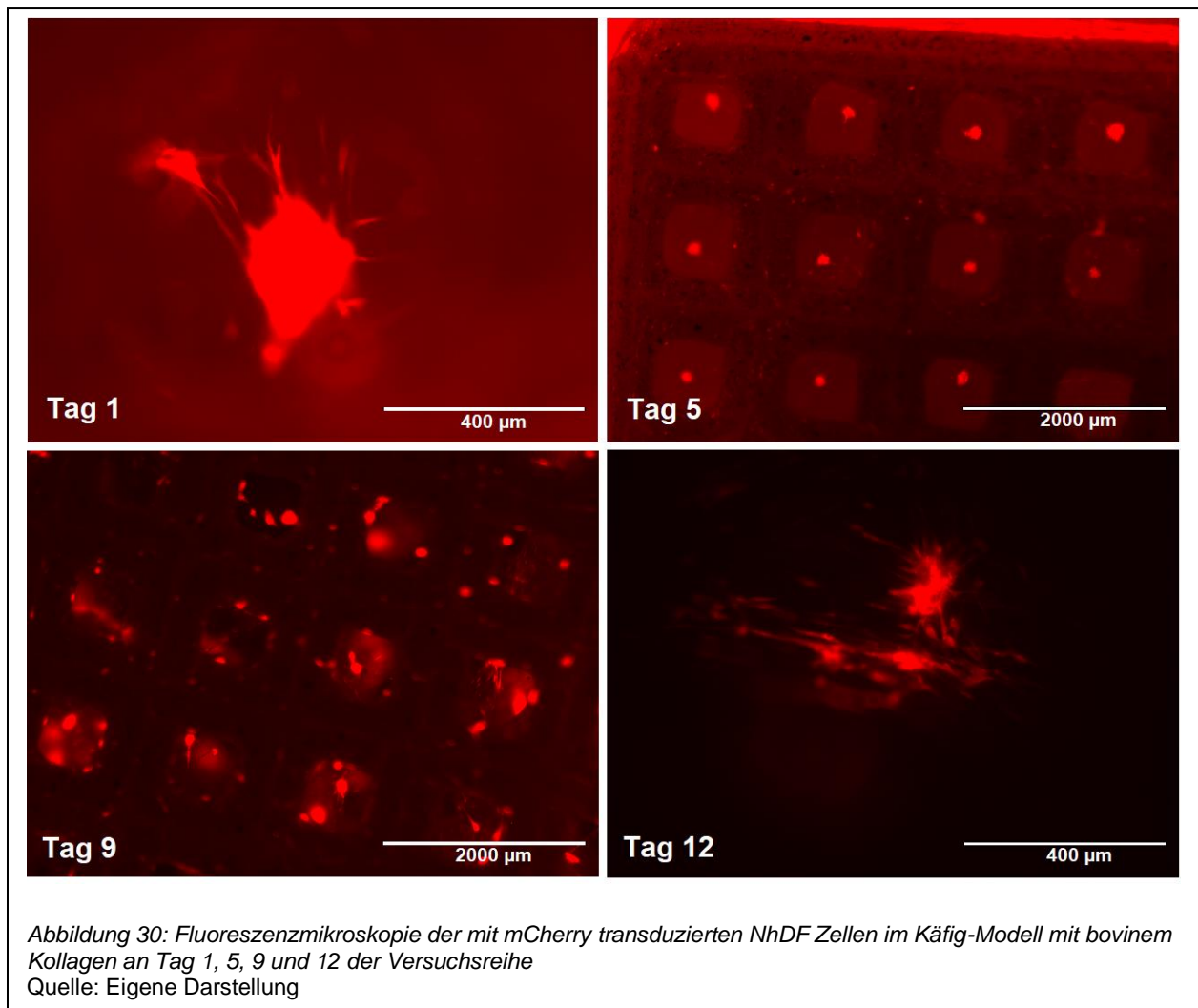


Die Zellen der SaOS Reihe, welche in Abbildung 28 abgebildet sind, zeigten im bovinen Kollagen ab dem dritten bis vierten Tag eine vermehrte Interaktionstendenz [Tag 5]. Die Fotodokumentation zeigt den Beginn der Ausbildung von Pseudopodien sowie die dreidimensionalen Gebilde bei initialer Konfluenz. Diese bildeten eine Art Gerüst für die weitere Zellproliferation. Letztlich kam es zu einer ubiquitären Durchbauung des Kollagengels [Tag 9] in einem insgesamt regelmäßigem Durchbaumungsmuster mit multiplen Poren durchspannenden Brückenbildungen [Tag 12].

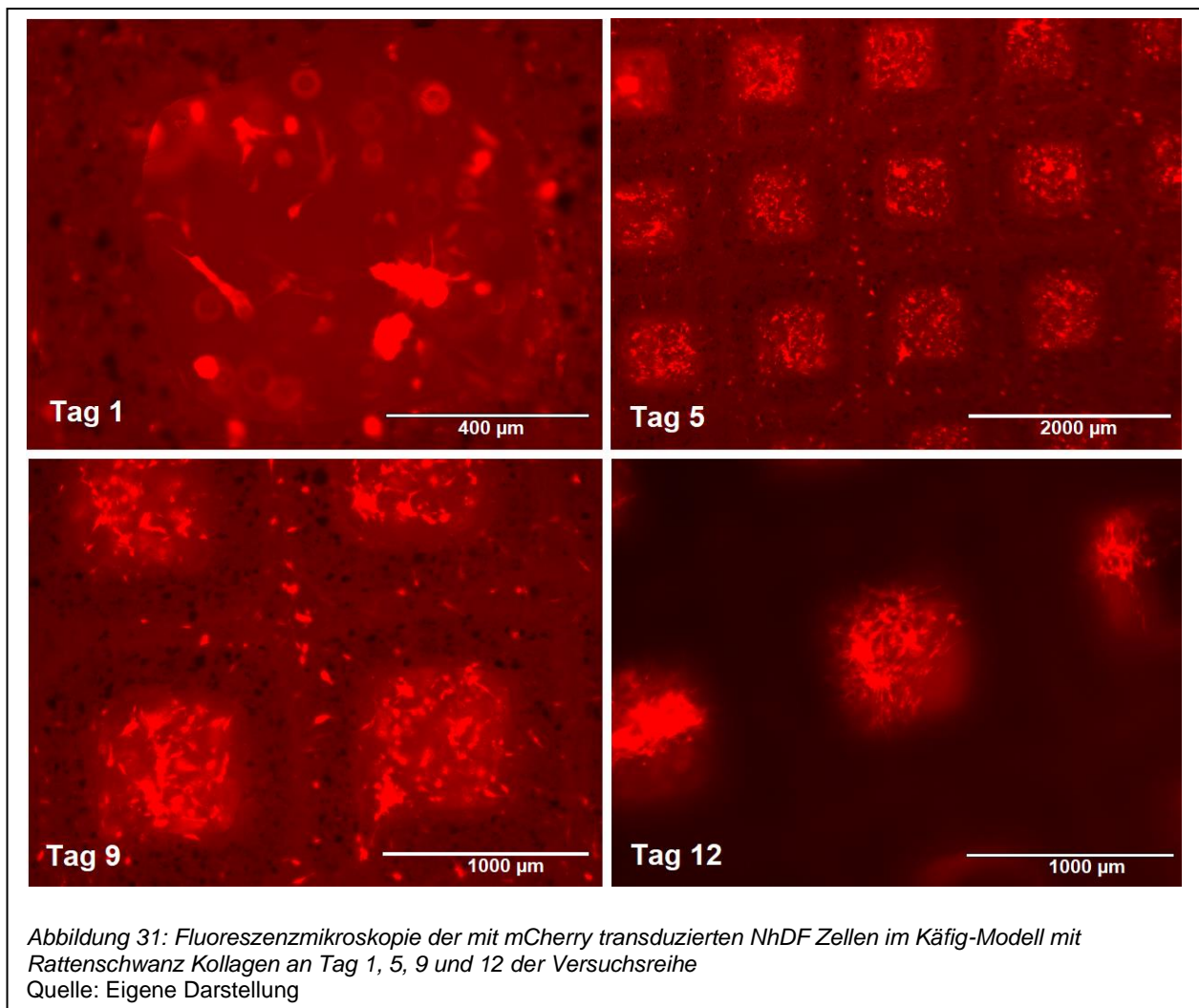


Bei der Anzucht in Rattenschwanz Kollagen zeigte sich wie in Abbildung 29 visualisiert ein ähnliches Proliferations- und Durchbaumungsmuster, Zellkonglomerate waren jedoch nicht zu beobachten. Im Vergleich der Durchbauung war kein wesentlicher visueller Unterschied in den Kulturen in bovinem und Rattenschwanz Kollagen zu beobachten, das Interaktionspotential [Tag 9], sowie die Tendenz zur Brückenbildung, schien im Rattenschwanz Kollagen jedoch geringer [Tag 12].

4.5.2.4 NhDF in PLA-Käfigen mit bovinem und Rattenschwanz Kollagen

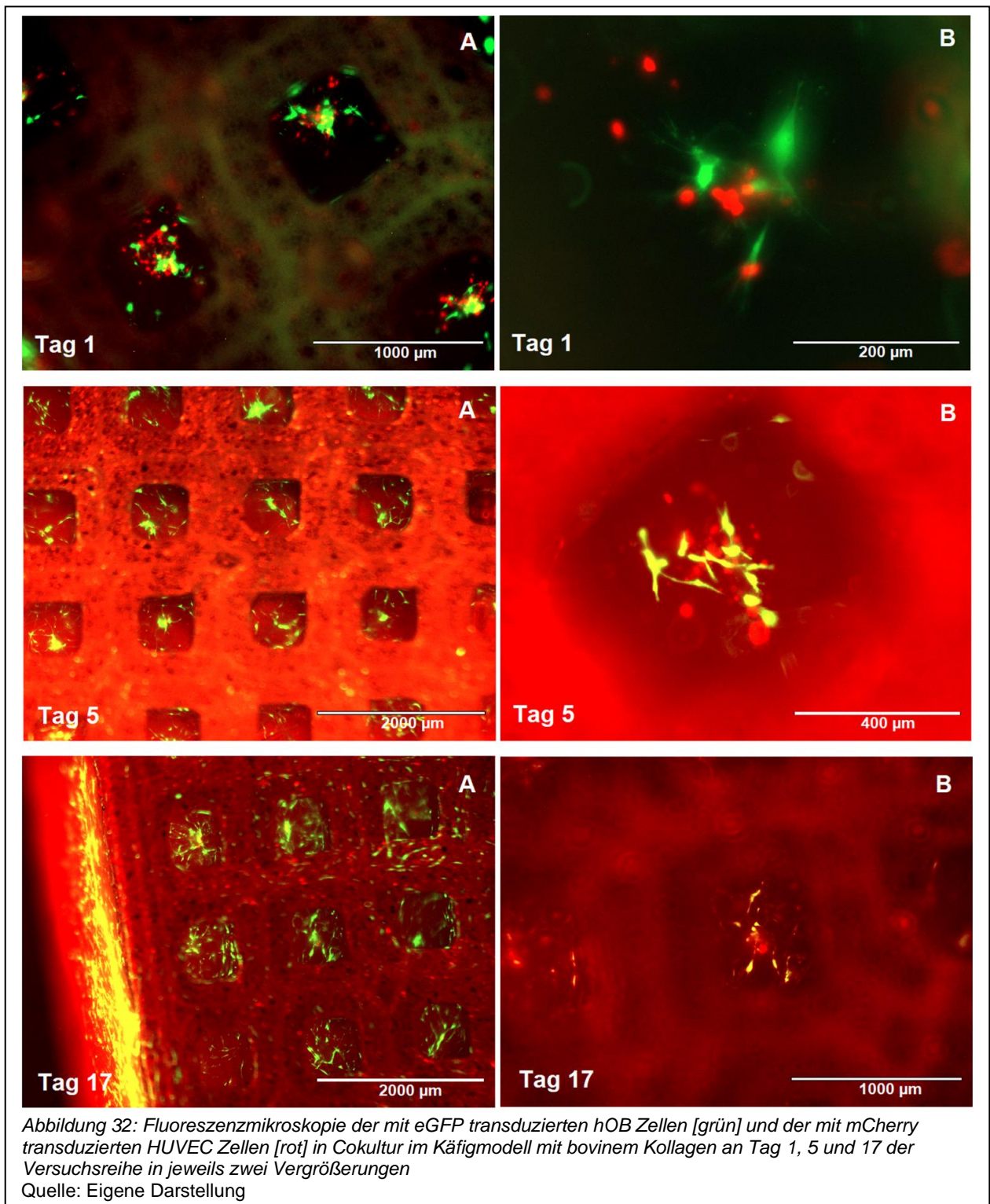


Im Fall der NhDF kam es bei der in Abbildung 30 dargestellten Anzucht im bovinen Kollagen nahezu ausnahmslos zunächst zur Bildung von Zellballen [Tag 1, Tag 5] und im weiteren Verlauf zur Auflockerung zu Geflechtem mehrerer Zellgruppen [Tag 9]. Insgesamt zeigte sich eine sehr gute Proliferation mit Durchspannung der Porenstrukturen durch ankernde Zellausläufer [Tag 12].



Die Anzucht in Rattenschwanz Kollagen in Abbildung 31 zeigt eine ausgeprägte Proliferation mit wesentlich aufgelockerter Zellanordnung mit nur wenigen Zellballen [Tag1, Tag 5]. Nach knapp über einer Woche zeigte sich eine dichte, annähernd vollständige Durchbauung der Käfigporen [Tag 9]. Die Zellen zeigten hierbei ein hohes Maß an Interaktion. Somit ließ sich für NhDF als einzige Zellreihe ein insgesamt besseres Kulturergebnis in Rattenschwanz Kollagen erkennen. Die Kultur in bovinem Kollagen führte hier jedoch ebenfalls zu guten Ergebnissen.

4.5.3 Cokultur von HUVEC und hOB Zellen



Die Visualisierung der Cokultur von endothelialen HUVEC Zellen [rot] und osteogenen hOB Zellen [grün] in Abbildung 32 wurde durch die Virustransduktion mit verschiedenfarbigen

Fluoreszenzgenen möglich gemacht. Je nach Gewichtung der roten oder grünen Fluoreszenz erscheinen die Fotos hier mehr im Rot- oder Grünspektrum.

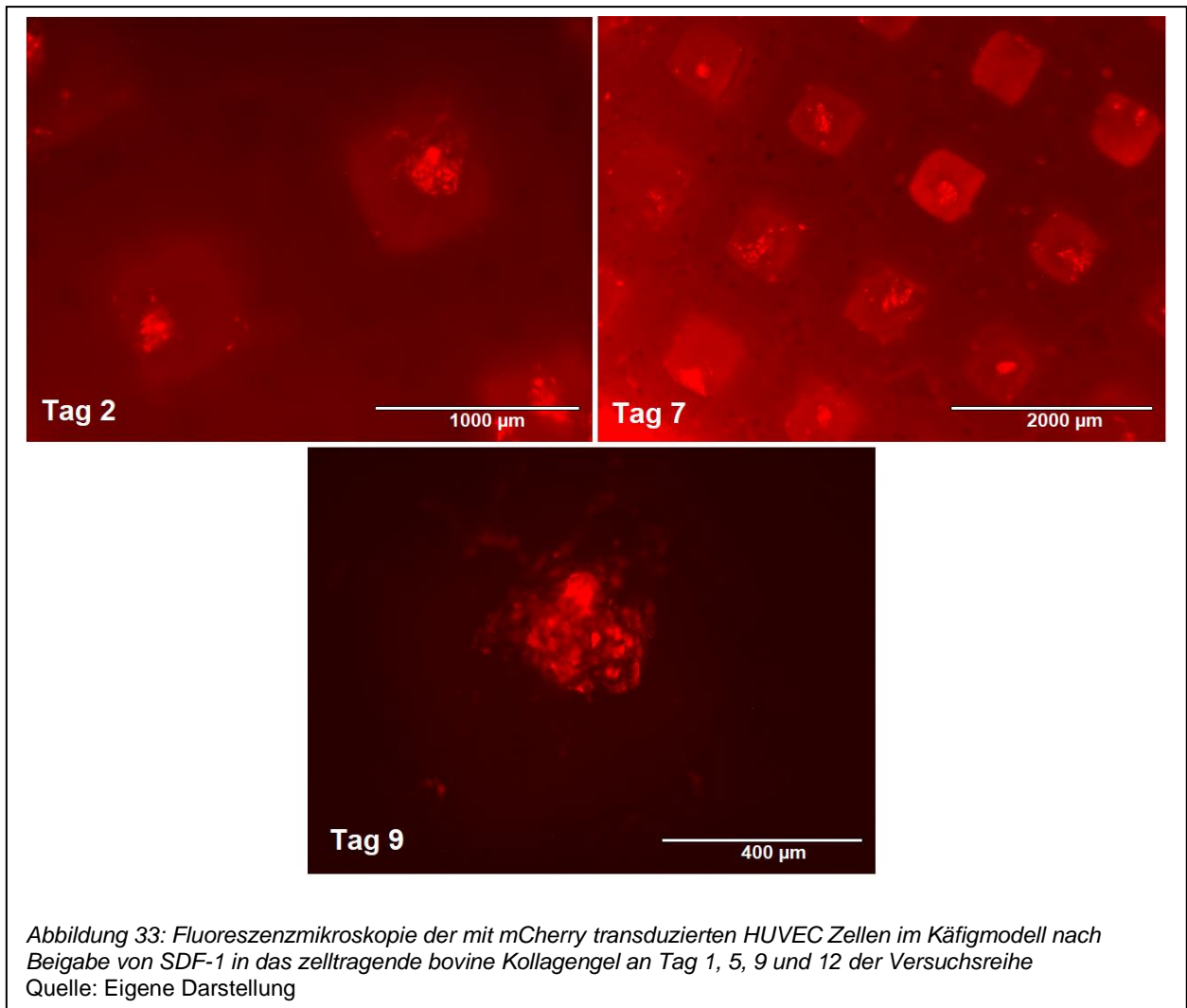
Die Cokultur der hOB und HUVEC zeigte eine deutliche Proliferation beider Zellreihen mit hohem Interaktionsmaß bereits zu Versuchsbeginn [Tag 1 A]. Die Adhäsion an den Porenwänden zeigte sich vorwiegend durch die Zellen der hOB getragen, wie auch bereits in der Monokultur beobachtet [Tag 1 B]. Die HUVEC dagegen bildeten mit den hOB integrierte Zellverbände, welche sich durch die Käfigstrukturen zogen und verzweigten. Dieses Verhalten konnte bereits in den ersten Tagen nach Aussaat beobachtet werden [Tag 5 A und B]. Die aus beiden Zellreihen bestehenden Konglomerate verdichteten sich über die Versuchsphase stetig und wiesen eine zunehmende Komplexität der Anordnung auf. Zusätzlich ließ sich eine flächige Absiedelung beider Zellreihen auf den Außenseiten des Käfig-Modells beobachten [Tag 17 A]. In den Porengittern zeigte sich oft ein hOB Kern mit umschließenden HUVEC, welche wiederum von Pseudopodien der hOB mittig der Poren suspendiert wurden [Tag 17 B].

4.6 Wachstumsfaktor SDF-1

4.6.1 Einfluss von SDF-1 auf Endothelzellen im Käfig-Modell

In der Untersuchung der Modelle, welchen Stromal cell derived factor 1 (SDF-1) im bovinen Gel beigefügt wurde, zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen der in das Gel eingesetzten und der dem Käfig aufgesetzten HUVEC Population.

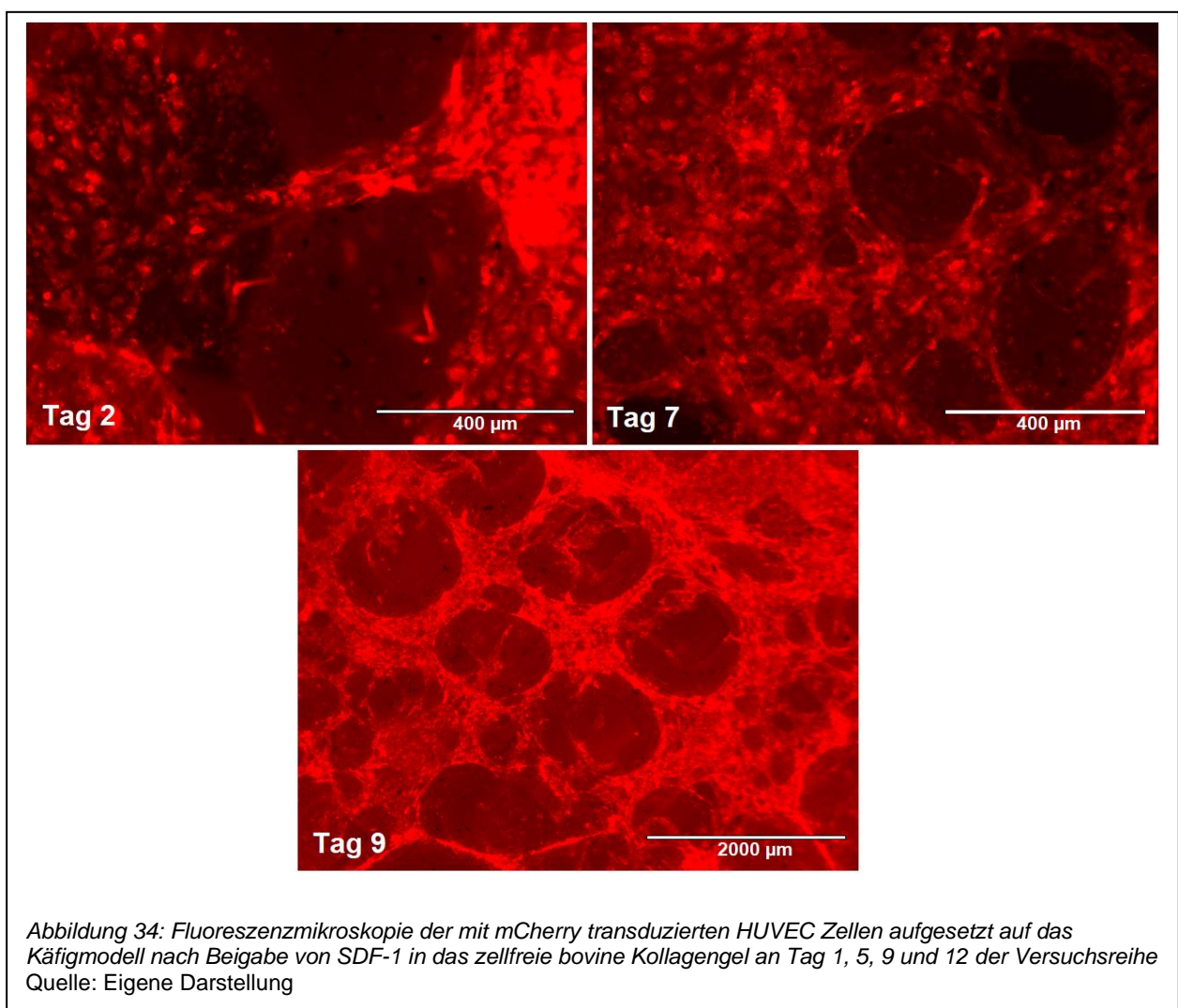
4.6.1.1 Käfig-Modell mit SDF-1 im Kollagengel und eingebrachten HUVEC Zellen



Die in Abbildung 33 dargestellten eingesetzten Zellen zeigten ein bereits im bovinen Kollagen beobachtetes Verhalten mit Bildung komplexer Röhrenstrukturen, welche einer beginnenden Neovaskularisierung nahekamen. Im Gegensatz zur wachstumsfaktorfreien

Kultur war dieses Verhalten jedoch wesentlich beschleunigt und zeigte sich bereits frühzeitig nach Aussaat [Tag 2]. Zudem zeigten sich die Strukturen wesentlich zellreicher. Im Verlauf der weiteren Beobachtung zeigten sich multiple Röhrengebilde pro Käfigpore, deren Wandstrukturen sich Zusehens verdichteten [Tag 7, Tag 9]. Ab etwa dem neunten Tag konnte bei annähernd vollständiger Durchsetzung der Käfige mit Zellstrukturen kein wesentlicher visueller Unterschied mehr festgestellt werden. Die Kultur blieb bis zum Versuchsende stabil in der beschriebenen Form bestehend.

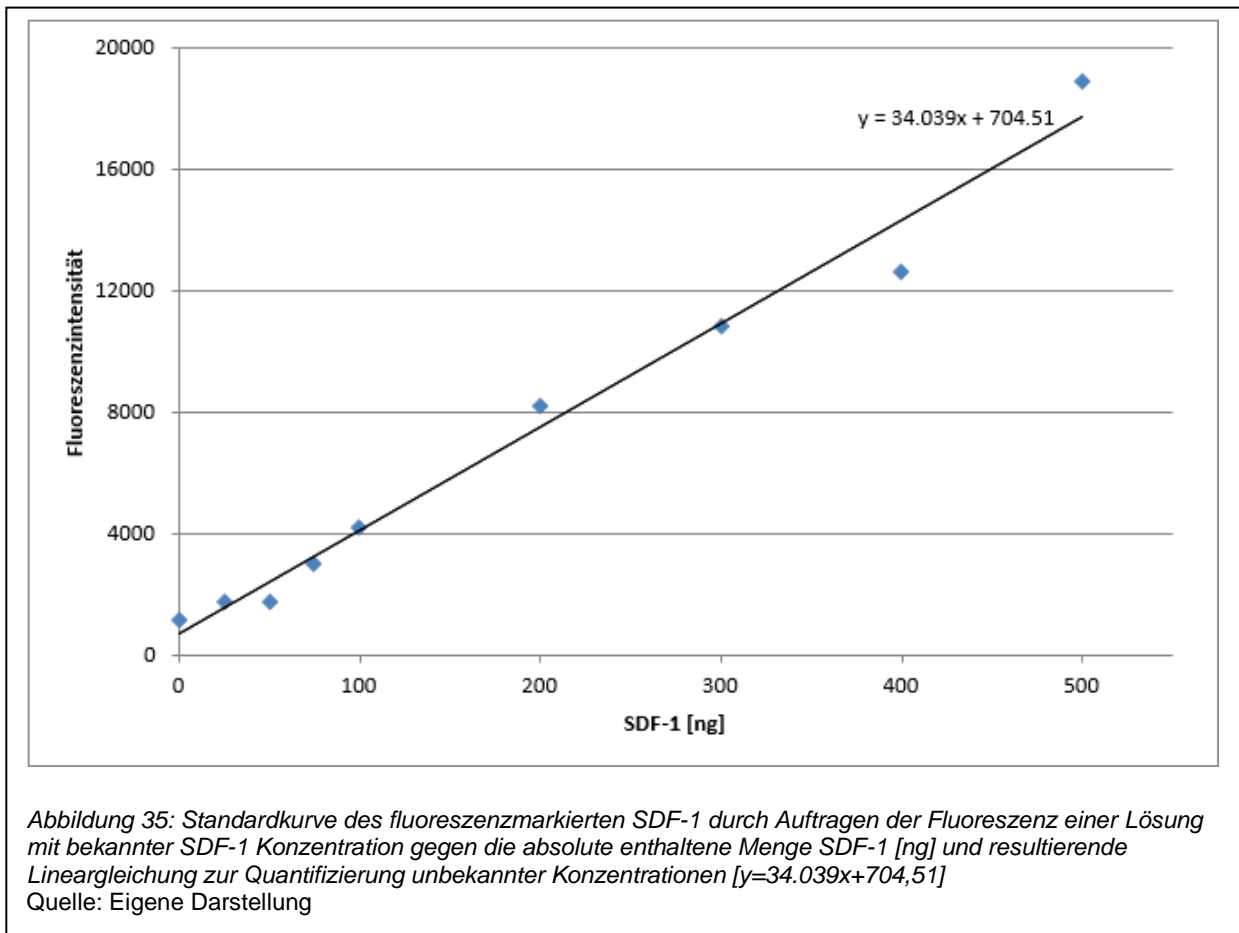
4.6.1.2 Käfig-Modell mit SDF-1 im Kollagengel und aufgebrachten HUVEC Zellen



In der Kultur mit im Kollagengel enthaltenem SDF-1, welcher HUVEC aufgesetzt wurden, zeigte sich ein grundlegend anderes Verhalten. Dies wurde in Abbildung 34 gezeigt. Die Zellen bildeten ab Beginn der Kultur Komplexverbände, welche die Käfig-Modelle netzartig

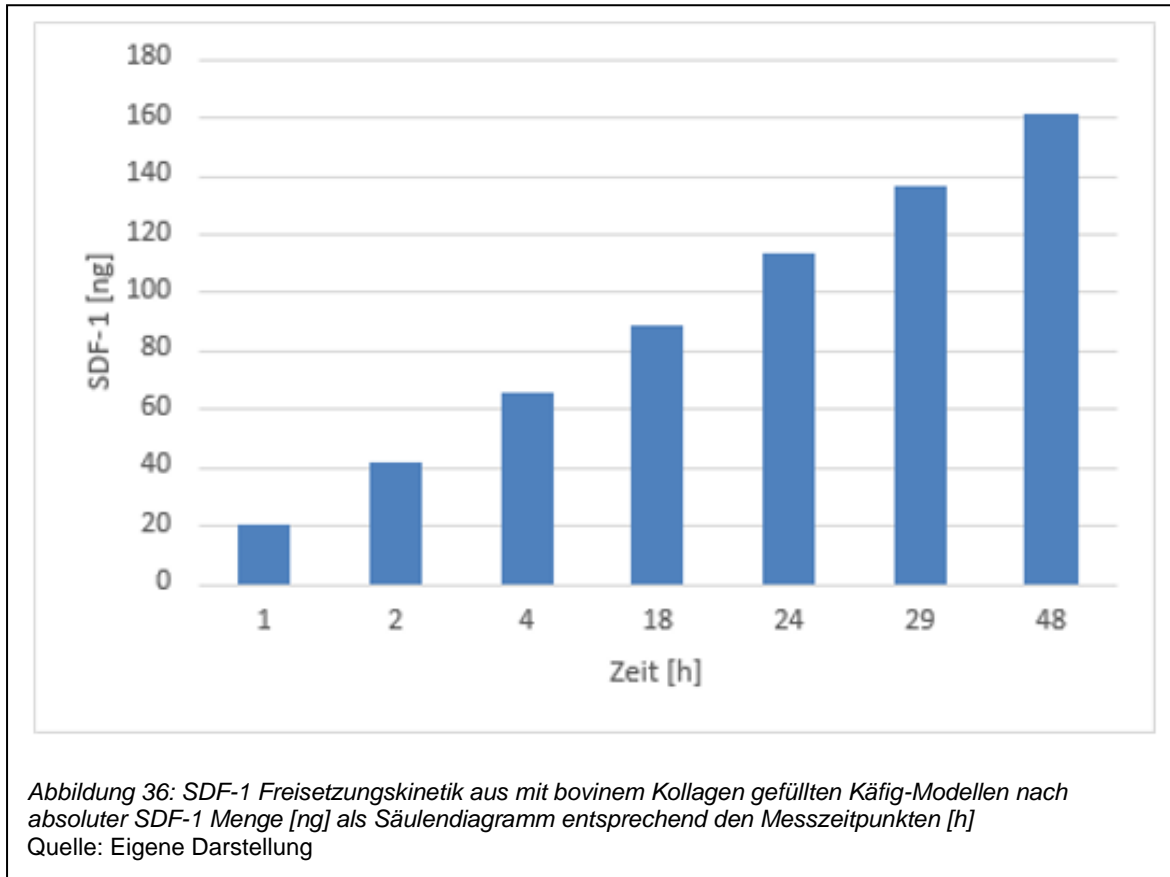
überzogen [Tag 2]. Hierbei kam es zunächst den Gitterstrukturen aufliegend zu einer rapiden Proliferation und Zell-zu-Zell Adhäsion. In den nächsten Tagen konnte eine zunehmende Einwanderung der Netzstruktur in die Käfig-Modelle beobachtet werden [Tag 7]. Einzelne Zellstränge wanderten entlang der Porenwände in die Tiefe und durchsetzen schrittweise das PLA-Gebilde. Dies geschah zunächst brückenartig durch einzelne Ausläufer der Makrostruktur und schließlich flächendeckend im Sinne einer vollständigen, teils mehrschichtigen, Gewebeauskleidung des PLA-Gerüsts [Tag 9]. Die Visualisierung von möglichen Zellstrukturen im Inneren der Käfig-Modelle war aufgrund der äußeren Zelldichte nicht mehr möglich.

4.6.2 SDF-1 Freisetzungskinetik aus dem kollagengefüllten Käfig-Modell



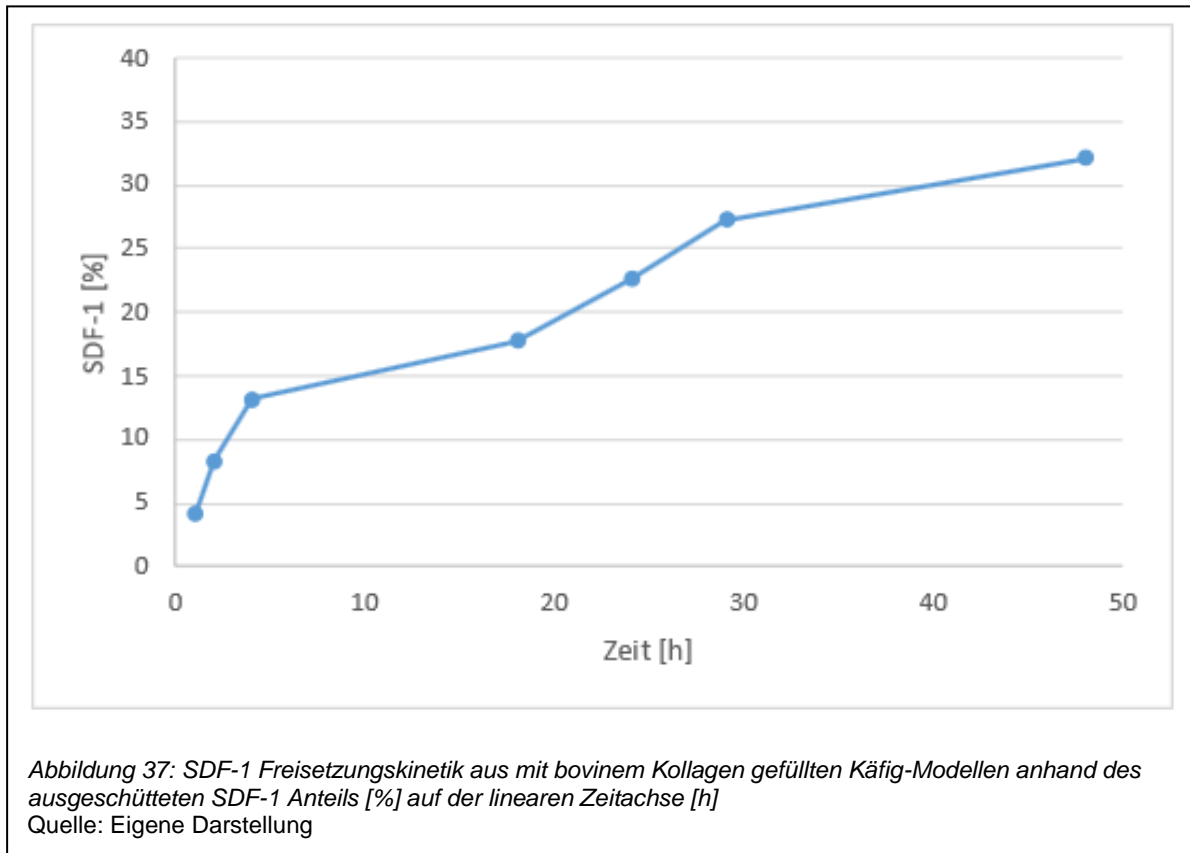
Die in Abbildung 35 gezeigte Standardkurve zur Freisetzungskinetik des Wachstumsfaktors SDF-1 wurde durch das Ansetzen von Lösungen erstellt, welche verschiedene Konzentrationen des Faktors enthielten. Durch die Markierung der SDF-1 Moleküle mit rotem Fluoreszenzmarker konnte die resultierende Fluoreszenz Lösungen verschiedener Konzentrationen analysiert und graphisch dargestellt werden. Zu diesem Zweck wurden die

gemessenen Fluoreszenzwerte korrelierend mit der angesetzten SDF-1 Konzentration im gezeigten Diagramm aufgetragen. Hieraus konnte eine Lineargleichung hergeleitet werden, welche zur Quantifizierung unbekannter SDF-1 Konzentrationen herangezogen werden konnte.



Im Folgenden wurden Käfig-Modelle mit bovinem Kollagengel befüllt, welches mit 500ng SDF-1 beladen war. Diese Modelle wurden in PBS gelegt und der Überstand nach 1; 2; 4; 18; 24; 30 und 48 Stunden auf seine Fluoreszenz, also seinen SDF-1 Gehalt, überprüft. Es wurde bovines Kollagen gewählt, da sich dieses in den vorangehenden Versuchen als für die Zellreihen vorteilhafter erwiesen hatte. Die Ergebnisse der Untersuchung wurden in Abbildung 36 aufgezeigt. Aufgetragen wurde zunächst die im Überstand festgestellte, errechnete, absolute SDF-1 Menge gegen die beschriebenen, absoluten Messzeitpunkte.

Weiterhin wurde der prozentual aus dem Käfig gelöste Anteil der initial im Modell immobilisierten SDF-1 Menge auf dem linearen Zeitstrahl aufgetragen.



Von Messzeitpunkt zu Messzeitpunkt zeigte sich ein nahezu gleichmäßiger Austritt des SDF-1 aus dem Käfig-Modell. In der linear nach der Zeit abgebildeten Verlaufsdarstellung in Abbildung 37 zeigte sich jedoch eine beschleunigte Auswaschung in Phasen vermehrter Probenentnahmen. Insgesamt waren nach 48 Stunden noch knapp 340ng SDF-1 im Käfigmodell enthalten, dies entsprach 68% der initial im Gel enthaltenen Menge.

5 Diskussion

Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Forschungsergebnisse interpretiert, kritisch hinterfragt und in den Stand der Literatur eingeordnet. Weiterhin werden Vorschläge zur Forschungsvertiefung gemacht und Anstöße für mögliche Folgeprojekte gegeben.

Die durchgeführten Versuche dienten der Erforschung neuer Möglichkeiten zur Überbrückung langstreckiger Knochendefekte nach Traumata, össären Infektionen oder malignen Erkrankungen mit ausgeprägten Substanzverlusten. Im Rahmen dieser Versuche wurde ein dreidimensionales Modell in poröser Käfigform erstellt, welches mit Kollagengel und osteogenen Zellreihen befüllt wurde. Dies sollte eine Basis für spätere komplexere dreidimensionale Drucke bilden, welche patientenspezifisch an individuelle Knochendefekte angepasst werden könnten.

5.1 Biokompatibilität

Begonnen wurde der experimentelle Teil des Projekts mit einer Prüfung der Biokompatibilität des PLA Käfig-Modells mittels eines MTT-Assays. Dieses bildet den Standard der Biokompatibilitätsprüfung nach europäischer Norm ab, dennoch empfehlen diverse Studien die weitere Prüfung und Durchführung ergänzender Testprotokolle (Ghasemi, et al., 2021). Das durchgeführte MTT-Assay zeigte eine gute Biokompatibilität des verwendeten Werkstoffs nach dem 3D-Druck in Käfig-Form. Die europäische ISO-Norm 10993-5, welche die Grenzwerte für die Sicherheit von Medizinprodukten festlegt, wurde erfüllt.

Das PLA zeigte über eine Zeitspanne von 48 Stunden keinerlei relevante Zytotoxizität. Dies entspricht den bereits in anderen Studien dargelegten Ergebnissen, welche PLA als einen sicheren und wertvollen Werkstoff auf der Suche nach Knochenersatzkomponenten abbildeten (Diomede, et al., 2018).

Dennoch kann es gerade bei einer kleinen Versuchsgröße zu Ungenauigkeiten der MTT-Assay Auswertung kommen. Als mögliche Verursacher dieser Messungenauigkeiten werden weiterhin schwankende Vitalitätsparameter der eingesetzten L929 Zellen benannt (Grela, et al., 2015).

Es stehen andere mögliche Assays zur Determination der Biokompatibilität zur Verfügung, deren Durchführung vor der Ausweitung der Versuche und Übergang in die in-vivo Phase des Forschungsprojekts angezeigt sein könnten. So könnten, wie Studien andeuten,

möglicherweise exaktere und weniger fehleranfällige Ergebnisse in der Prüfung der Biokompatibilität erreicht werden (van Tonder, et al., 2015). In jedem Fall wäre eine Ausweitung der Versuchsreihen als vorteilhaft zu bewerten.

5.2 Ausschluss von Endotoxinkontaminationen

Weiterhin wurden relevante Endotoxin-Kontaminationen mittels eines LAL-Assays ausgeschlossen. Der FDA-Grenzwert, welcher die maximal zulässige bakterielle Belastung festlegt, um Infektionen nach der Implantation zu vermeiden, wurde eingehalten. Das LAL-Assay stellt eine Möglichkeit zur schnellen und effektiven Detektion von gramnegativen Bakterien dar, weshalb es als Standardverfahren zur Aufdeckung von Endotoxin-Verunreinigungen in medizinischen Produkten gilt (Tamura, et al., 2021). Dieser sicherheitsrelevante Ausschluss konnte nur nach Durchführung des eigens entwickelten Desinfektionsprotokolls erfüllt werden, wodurch die Bedeutung der optimalen Vorbehandlung der Modelle verdeutlicht wird. Dem Ziel der Entwicklung verbesserter Sterilisationsprotokolle für PLA widmen sich bereits Autoren weiterer Studien (Pérez Davila, et al., 2021). Zusätzlich wird geprüft, welche Verfahren eine Veränderung des Werkstoffs vermeiden (Łopianiak & Butruk-Raszeja, 2020).

Auf Grundlage dieser Arbeiten könnten im Bereich der Materialvorbereitung gegebenenfalls eine zukünftige Optimierung erfolgen. So könnten spezifische Zeitfenster und Spülzyklen ermittelt werden, um ein möglichst zeiteffizientes und vor allem konstantes Ergebnis in der Reduktion möglicher bakterieller Kontaminationen zu erreichen. Weiterhin sollte eine durchgängige engmaschige Kontrolle der hergestellten Modelle die Aufrechterhaltung des nötigen hohen Sicherheitsstandards garantieren. Diesbezüglich ist ein besonderes Augenmerk auf multiresistente Erreger zu legen, deren Eradikation bei Kontaminationen von medizinischen Produkten und Implantaten oft besondere Schwierigkeiten verursacht (Josephs-Spaulding & Singh, 2021). Ihre Präsenz kann nicht beherrschbaren Infektionen mit schweren Krankheitsverläufen der betroffenen Patienten führen (Alexopoulou, et al., 2016). Weiterhin existieren diverse andere Formen der Sterilisation, zu denen chemische und physikalische Verfahren wie die Thermosterilisation, Begasung oder Bestrahlung zählen (Kramer, et al., 2016). Diese, beispielsweise die Thermosterilisation, sind teils nicht für den Werkstoff PLA geeignet, da dieser durch das Verfahren Schaden nehmen könnte. Dennoch wäre eine Exploration möglicher Alternativverfahren zur Modellvorbereitung sinnvoll. Dies gilt vor allem dann, wenn schnellere oder effektivere Verfahren gefunden werden können. Ähnliches wurde auch für andere biologisch abbaubaren Polymere beschrieben, welche im Vergleich zu seit längerem genutzten chirurgischen Materialien keinen Nachteil im Bereich der Sterilität nach entsprechender Vorbehandlung und Anwendung boten (Martins, et al., 2020).

5.3 Zellvitalität auf PLA-Modellen

Die Färbeversuche mit Resazurin dienten der Prüfung der Zellvitalität über einen gesetzten Zeitraum von bis zu zwei Wochen. Die Prüfung dieser wurde für kollagenfreie PLA-Scheiben, für Kollagen ummantelte Scheiben sowie für die mit Kollagengel gefüllten Käfig-Modelle durchgeführt. Hier wurde zudem erneut die Unterscheidung zwischen Rattenschwanz und bovinem Kollagen getroffen. Insgesamt zeigte sich eine gute Zellvitalität auf den PLA Modellen.

Die Ummantelung der PLA-Scheiben mit Kollagengel führte laut Versuchsauswertung zu einer Zunahme der Zellvitalität. Vor allem die im kollagenfreien Modell beobachteten Vitalitätsrückgänge in der Spätphase, also nach etwa einer Woche in Kultur, fielen in den Kollagen enthaltenden Modellen geringer aus und wurden im Folgenden besser durch die Zellpopulationen kompensiert. Hier wären aufgrund der kleinen Versuchsgröße jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um mögliche konfundierende Einflüsse anderer Faktoren auszuschließen. Zu diesen könnten beispielsweise Schwankungen in den Umgebungsparametern, dem Intervall der Zellfütterung, also der Zugabe von neuem Medium, und dem lokalen Sauerstoffgehalt in der Kultur zählen (Place, et al., 2017). Solche und ähnliche Abweichungen könnten durch parallele Durchführung der Versuchsreihen und entsprechend gleiche Ablaufmuster vermieden werden. So sind gegebenenfalls auch die in den Ergebnissen der Färbeversuche festzustellenden intermittierenden Stabilisationen und Regressionen der Zellvitalität auf den Rhythmus der Zellfütterung zurückzuführen.

5.4 Vergleich des Zellverhaltens auf bovinem und Rattenschwanz Kollagen

Alle vier Zellreihen zeigten ein sehr gutes und, mit Ausnahme der NhDF Zellen, verbessertes Proliferations- und Adhäsionsverhalten in bovinem Kollagen. Dies war vor allem im Fall der HUVEC Reihe zu beobachten, welche insgesamt in Kollagen wesentlich besser als auf kollagenfreiem PLA proliferierte. Dies bestätigt bereits existierende Studien zu den Vorteilen der dreidimensionalen Zellkultur in Kollagen, laut denen die Zellcharakteristika im Kollagenmodell verglichen mit der zweidimensionalen Standardkultur wesentlich näher am in-vivo Zustand liegen (Yeung, et al., 2019). Im Vergleich zu aus Rattenschwänzen gewonnenem waren durch die Nutzung von bovinem Kollagen eine weitere Vitalitätssteigerung und eine optimierte Populationsstabilität zu verzeichnen. Dem ist ein hoher Stellenwert beizumessen, da die Endothelzellreihe eine besondere Relevanz für die Ergebnisse des Forschungsprojekts hat. Es existieren bereits Studien zu verschiedenen Kollagenquellen, welche die Vorteile von Säugetierkollagen gegenüber beispielsweise marinem Kollagen und seinem Nutzen in der Forschung untersuchen (Paradiso, et al., 2019).

Marinem Kollagen konnte unerwarteterweise in-vivo eine gute Biokompatibilität und Vaskularisierung in Knochenersatzprodukten in Ratten nachgewiesen werden (Flaig, et al., 2020).

Eine Detailanalyse der zugrundeliegenden Faktoren und die Identifikation des idealen Trägerkollagens wären weitere wichtige Schritte auf dem Weg zur Verbesserung des vorgeschlagenen Knochenersatzes. Auch die Nutzung von humanem Kollagen sollte vergleichend geprüft werden. Die in diesem Feld gemachten Schritte zeigen jedoch bereits divergierende Stärken und Schwächen einiger der existenten Kollagenprodukte (Meyer, 2019).

Der Grund für die in dieser Arbeit gezeigten besseren Ergebnisse in bovinem Kollagen ist ein Thema, dessen weitere Erforschung wichtige Hinweise für die Idealkonditionen speziell auch zur Entwicklung von vaskulären Strukturen erbringen könnte. Es sollten jedoch auch Confounder, wie Unterschiede in der Viskosität oder dem Polymerisierungsverhalten der Gele, als Auslöser ausgeschlossen werden. So zeigt eine Studie bereits ein ideales Fenster bezüglich der Dichte der Kollagengele, um eine bestmögliche Zellproliferation zu erreichen (Cross, et al., 2010). Die Dichtemessung der verwendeten Gele sowie der Vergleich weiterer Versuchsreihen könnte ein Divergieren durch Abweichungen in den Versuchsgrundlagen ausschließen.

Neben den Kollageneigenschaften selbst sollte auch das Einbringen von stabilisierenden Komponenten, wie beispielsweise Hydroxylapatit vor dem Hintergrund der Optimierung der mechanischen Eigenschaften des Knochenersatzprodukts (Ryan, et al., 2015) untersucht und abgewogen werden. Dieser Thematik widmen sich bereits mehrere Studien mit vielversprechenden Ergebnissen.

5.5 Vergleich variierender initialer Populationsgrößen

Die Populationsgröße bei Aussaat machte laut den Ergebnissen der Färbeversuche mit Resazurin keinen deutlichen Unterschied in der Entwicklung der Kulturen. Geprüft wurde hier jeweils der Vergleich zwischen 50.000 und 100.000 Zellen pro PLA-Modell. Die Studienlage wies auf einen Einfluss der Zelldichte in dreidimensionalen Kulturen hin, welcher sich je nach Zellreihe unterschiedlich darstellen könnte. So wurden Unterschiede in den intrazellulären Abläufen von dichten und weniger dichten Kulturen festgestellt (Trajkovic, et al., 2019). Möglicherweise konnten in dieser Versuchsreihe keine gravierenden Unterschiede in der Kulturentwicklung observiert werden, da die kritische Masse der Zellzahl nicht erreicht wurde.

Die Endothelzellen der HUVEC Reihe zeigten ein insgesamt erschwertes Anzuchtverhalten. Reduzierte Populationsgrößen schienen im Fall der HUVEC bei Aussaat von 50.000 statt

100.000 Zellen vorteilhaft zu sein, was erneut die Theorie einer kritischen Maximalzellzahl stützt. Dies könnte beispielsweise einem erhöhten Nährstoffbedarf oder einer größeren Anfälligkeit bezüglich der pH-Schwankungen des Mediums geschuldet sein. Diese Probleme sind in der Anzucht von Endothelzellen bereits bekannt und verschärfen sich bei der Formierung von Gewebestrukturen (Gurevich, et al., 2021). So bildet die Stabilisierung der Kultur sowie die spätere umgebungsspezifische Anpassung der Endothelzellen eine zu erwartende Schwierigkeit (Gifre-Renom, et al., 2022). Aus den genannten Gründen wäre hier erneut die zeitliche Ausdehnung der Versuchsreihen zur Prüfung der Resilienz im Käfig-Modell vorzuschlagen.

Die Fibroblasten der NhDF Reihe erwiesen sich als wesentlich resilienter und weniger sensibel bezüglich der Kulturform. So proliferierten sie mit und ohne Kollagen sowie auf Scheiben- und Käfig-Modellen gleichermaßen stabil.

5.6 Virustransduktion von Fluoreszenzgenen

Zur Ermöglichung einer visuellen Darstellung der dreidimensionalen Zellkulturen im Modell, wurden die verwendeten Zellreihen durch Virustransduktion mit Fluoreszenzgenen versehen. Dies stellt ein gut etabliertes Vorgehen zur Zellvisualisierung und optischen Auswertung dar (Zimmer, 2002). Die Erfolgskontrolle dieser Virustransduktion erfolgte durch FACS Messungen. Diese zeigte eine erfolgreiche Transduktion der Zellreihen NhDF, hOB und HUVEC. Die SaOS Zellreihe hingegen zeigte lediglich eine Fluoreszenzrate von durchschnittlich 41%, sodass eine erneute Virustransduktion erfolgte. Diese führte schließlich zum Erfolg mit einer mehr als verdoppelten Transduktionsrate von nun 99%. Durch die erfolgreiche Virustransduktion der vier Zellreihen konnte der wichtige Zwischenschritt der Visualisierung des Zellverhaltens erfüllt werden, durch die eine vollumfängliche Auswertung der Versuchskulturen im dreidimensionalen Modell ermöglicht wurde.

Zusätzlich wurde durch die Virustransduktion der Fluoreszenzgene für die Farben Grün und Kirschrot die Möglichkeit zur Analyse zweier Zellpopulationen in einer Cokultur geschaffen. Es wurden die Zellinteraktion darstellbar gemacht und eine sichere Differenzierung der Zellreihen ermöglicht. Hierzu existieren diverse Vorgehenshinweise zur Wahl der adäquaten Fluoreszenzmarker (Shaner, et al., 2005). Ohne die Fluoreszenzmarkierungen wäre die spätere Versuchsreihe, welche eine Kombination der Zellreihen hOB und HUVEC vorsah, nicht auswertbar gewesen.

Das Ziel der adäquaten Visualisierung zur späteren Auswertung des Zellverhaltens konnte so erfüllt werden. Die Auswertung erfolgte in dieser Versuchsreihe über eine Zeitspanne von maximal 13 Tagen. Sollte in weiteren Versuchen eine prolongierte Observationsphase

vorgesehen sein, wäre hier zuvor eine Prüfung der Persistenz der Zellfluoreszenz vorzunehmen. Somit könnten Ungenauigkeiten und Erschwernisse der späteren Auswertung vorhergesehen und vermieden werden. Insgesamt ist eine Reduktion der Stabilität der Fluoreszenzmarker über die Zeit bekannt, die hier verwendeten Marker sind jedoch bereits optimierte Versionen ihrer Vorgänger und von erhöhter Persistenz geprägt (Stepanenko, et al., 2007) (Rizzuto, et al., 1995).

5.7 Fluoreszenzmikroskopie

Es wurden die gesäten Zellreihen in der Kultur mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt und observiert. Störfaktoren bezüglich der Auswertung in der Fluoreszenzmikroskopie, beispielsweise Hintergrundfluoreszenz durch Bestandteile des Zellmediums wie Phenolrot und andere, wurden in anderen Studien diskutiert (Klimaj, et al., 2020), hatten jedoch keinen offensichtlichen Einfluss auf die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Observierungen. Die auf dem 3D gedruckten Werkstoff PLA erkennbaren Mikrorillenstrukturen boten Zellen der hOB und HUVEC Reihen sichtlich die Möglichkeit der Adhäsion, was sich in der Zellausrichtung entlang der Furchungen zeigte. Dies bewies erneut die Relevanz der Mikrostruktur der Modelloberfläche, welche bereits in vorhergehenden Arbeiten bezüglich verschiedener Materialien beschrieben wurde (Elter, et al., 2011). Die dargestellte Furchung ist ein bekanntes Produkt des Herstellungsprozesses im additiven 3D Druck (Armillotta, et al., 2018). Durch die während diesem Prozess herrschenden Temperaturen werden die Mikrorillen auf der PLA-Oberfläche jedoch bereits teilweise geglättet (Kafle, et al., 2021). Geglättete Flächen vereinfachen zwar die Sterilisation der Modelle, das Vorhandensein von porösen und vernetzten Strukturen, um die Zelladhäsion, Ausbreitung und Nährstoffversorgung zu verbessern, werden jedoch seit langem von multiplen Autoren und in diversen Materialien als förderlich erachtet (Xiao, et al., 2017) (Huang, et al., 2021). Dies fand hier im Käfig-Modell erste Anwendung.

Die Tendenz der Zellen zur Adhäsion im Bereich rauer Oberflächen konnte in den mit Kollagen ummantelten Versuchsreihen nicht mehr nachvollzogen werden. Hier bietet sich die Möglichkeit der weiteren Optimierung der PLA-Modelle. In anderen Arbeiten wurden bereits Möglichkeiten wie die Plasmamodifikation, Fluorierung oder chemische Behandlung der Materialoberfläche angesprochen (Schroepfer, et al., 2020), welche hier ebenfalls Anwendung finden könnten. Mit Hilfe dieser wäre eine stabilere Anheftung der Zellen am PLA-Werkstoff vorstellbar, welche sowohl mechanische (Shinde, et al., 2021) als auch positiv proliferative Effekte (Ungai-Salánki, et al., 2019) auf die Knochenersatzprodukte haben könnte. Speziell die Zellen der HUVEC Reihe könnten von diesen Optimierungen

profitieren, da sie bereits auf den nicht mit Kollagen vorbehandelten PLA-Scheiben ein deutlich erschwertes Adhäsionsverhalten zeigten.

Die Zellen der SaOS Reihe zeigten in der mit Kollagenmatrix umgebenen Kultur eine Konfluenz, welche teils zur Makrostrukturbildung führte. Dies konnte in den kollagenfreien Kulturen nicht nachvollzogen werden. Im Zusammenhang mit der starken Adhäsion der Zellreihen an den Nanostrukturen des PLA im kollagenfreien Modell, welche durch die Kollagenummantelung wesentlich reduziert wurde, spricht dies für eine stabilisierende Funktion des Kollagens bezüglich der Zell-Zell-Adhäsion (Hall, et al., 2016). Es kommt im Folgenden zu vermehrten Zell-Interaktionen, welche die Makrostrukturbildung und Formierung von komplexen Geweben erlauben (Mattes & Scholpp, 2018). Eine Kombination aus einer verbesserten Oberflächenbeschaffenheit, welche eine gleichmäßige Zelladhäsion unterstützt, und der Kollagenmatrix, welche die dreidimensionale Zellinteraktion fördert, könnte somit weitere Verbesserungen in der Gewebeerzeugung herbeiführen. Hierin ist eine Chance für die Verbesserung der Zelldynamik für zukünftige Versuchsreihen zu sehen.

5.8 Cokultur verschiedener Zellreihen

Die Cokultur der hOB und HUVEC zeigte eine ausgeprägte Zellinteraktion mit Bildung von Gewebestrukturen. Dies konnte bereits in vorhergehenden Studien gezeigt werden. So wurde beispielsweise innerhalb eines Calciumphosphatgerüsts die Bildung von vaskulären Komplexstrukturen gezeigt, deren Vitalität durch die Messung der Expression von Endothel-Wachstumsfaktor, sowie in Histologie und Elektronenmikroskopie bewiesen wurde (Thein-Han & Xu, 2013).

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse, welche in Cokulturen von HUVEC und osteogenen Zellen beobachtet werden konnten, zeichneten sich diverse zukünftige Herausforderungen ab. Zu diesen gehörte unter anderem das auszubauende tiefgreifende Verständnis der interzellulären Interaktionen und der funktionellen Heterogenität von endothelbildenden Zellen (Kocherova, et al., 2019).

Einzelne Studien wiesen zudem auf die positiven Effekte der Anwesenheit von sogenannten perivaskuläre Zellen zur Stabilisierung der Neovaskularisation hin (Wang, et al., 2019). Teils wurde sogar gezeigt, dass ohne solche sekundär unterstützenden Zellen, hier mesenchymale Stammzellen, keine langwierige Stabilisierung von vaskulären Strukturen erreicht werden konnte (Correia, et al., 2011). Hier bietet sich die Möglichkeit zur Einbringung der NhDF in weiteren Studien zu Mischkulturen, da die Zellreihe bereits ihre hohe Affinität zum dargestellten Modell erwiesen hat und den genannten Platz der perivaskulären Stabilisation einnehmen könnte.

Speziell die Aussaat der hOB/HUVEC-Cokultur in bovinem Kollagen führte in den Versuchsreihen zur Entstehung der erhofften Endothelröhrenstrukturen, welche auf eine mögliche Vaskularisierung der Modelle hinwies.

5.9 Beigabe von Wachstumsfaktor

Die Gefäßversorgung von Knochenersatzprodukten stand bereits im Fokus diverser vorhergehender Arbeiten. In diesen wurden unter anderem auch der Einsatz von Wachstumsfaktoren und Zellmediatoren auf die Vaskularisierung untersucht (Moccia, et al., 2019) (Ramasamy, et al., 2015). Auch in dieser Arbeit konnte durch das Einbringen des endothelen Wachstumsfaktors SDF-1 eine wesentlich gesteigerte Komplexität der entstehenden Zellkonglomerate erreicht werden.

Im Verlauf dieser Dissertation wurde erneut dargelegt, dass SDF-1 zur beschleunigten und stabilisierten Bildung von Endothelzellverbindungen führt, wie bereits durch andere Autoren beschrieben (Dimova, et al., 2019). Hierbei war eine deutliche Unterscheidung je nach Einbringungsort der HUVEC Endothelzellreihe festzustellen. Ein Einbringen in das Kollagengel durch Beigeben der Zellen in das angesetzte Gel vor Beladung des Käfigs führte zur erhofften Auskleidung der Poren des Käfig-Modells. Die resultierenden Zellgebilde können mit vaskulären Röhrenstrukturen verglichen werden. Hiermit wird ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur Vaskularisierung von Knochenersatzprodukten, oder zumindest einer Erleichterung der Versorgung durch Diffusion, wenn nicht durch aktiven Blutfluss, gemacht. Dies hatte sich bereits in verschiedenen anderen Studien als maßgebliche zu überkommene Hürde auf dem Weg zum langstreckigen Knochenersatz abgezeichnet (Vidal, et al., 2020). Parallel hierzu zeigte die Versuchsreihe, in welcher die Zellen den bereits mit Gel gefüllten Käfigen aufgesetzt wurden, vorrangig eine flächige Konfluenz, welche die Käfigporen überdeckte. Eine Gewebewanderung war teilweise zu erkennen. Hier muss erwähnt werden, dass eine weitere Observation des Käfiginneren nach der Ummantelung durch Endothelzellkonglomerate nicht mehr möglich war. Somit ist eine spätere Gewebedurchsetzung des Modells vorstellbar, konnte jedoch bisher nicht dargestellt werden. Unabhängig hiervon erscheint mit Hinblick auf die geplante klinische Anwendung das Einbringen der Zellen in das Gel vor Befüllung der Modelle die zu präferierende Vorgehensweise. Die Endothelzelldurchsetzung kann so sichergestellt werden. Zudem erscheint die Komplexität des Endothelzellgewebes maßgeblich von den umgebenden Strukturen beeinflusst zu werden, welche ihre Ausdehnung und das Maß der Konfluenz bedingen. Die Versiegelung der Modellporen erscheint in Bezug auf die Einbringung anderer, zum Beispiel osteogener Zellen, eher kontraproduktiv. So könnte es zu einer Versiegelung

von Modellanteilen kommen, welche das Einwandern anderer Zellreihen verhindern und die Nährstoffversorgung in diesen Gebieten unterbrechen könnte.

In weiteren Versuchen könnten andere oder Kombinationen verschiedener Wachstumsfaktoren untersucht werden, wie sie in anderen Arbeiten im Vergleich zur Einbringung von einzelnen Wachstumsfaktoren bereits zu verbesserten Raten der Zellproliferation führten (Sun, et al., 2013). Deutlich wird jedoch bereits der Erfolg des hier gezeigten Ansatzes und dessen hohe klinische Relevanz für die Zukunft. Adverse Effekte der Einbringung von Wachstumsfaktoren in den menschlichen Körper, wie das Risiko einer übersteigerten Proliferation oder Entartung, müssen im Vorfeld ausgeschlossen werden, denn andere Wachstumsfaktoren sind bereits mehrfach mit der Entstehung von malignen Erkrankungen in Verbindung gebracht worden (Dietrich, 2021) (Tillman, et al., 2016) (Vlasova-St Louis & Bohjanen, 2017). Auch SDF-1 wurde im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren sowie deren Resistenz gegenüber gängigen Chemotherapeutika impliziert (Tamamis & Floudas, 2014).

Die Konzentration des SDF-1 im Kollagengel und somit der Verlust in das umliegende Gewebe wurde in dieser Versuchsreihe durch ein mit Kollagen gefülltes und Wachstumsfaktor beladenes Käfig-Modell in PBS simuliert. Die Prüfung über den Zeitraum von zwei Tagen zeigte eine hohe Rate an Retention des eingebrachten SDF-1 mit stabiler Freisetzung in die direkte Gewebeumgebung. Sollte sich dies auf ein in-vivo Modell übertragen lassen, wäre ein hohe lokale Effizienz, also eine ausgeprägte Wirkung des Wachstumsfaktors im Bereich des Knochenersatzes und der direkten Umgebung, zu erwarten. Dies hat sich in Studien zur Wundheilung unter lokaler Wachstumsfaktortherapie bereits bewährt (Brem, et al., 2009). Im Fall von Knochenersatzprodukten könnte dies eine gezielte Vaskularisierung des Knochenersatzmaterials unter Einsprossen von Gefäßstrukturen aus der Defektumgebung bis hin zur Anastomosierung mit den Gefäßstrukturen innerhalb des Knochenersatzes bedeuten.

Gleichzeitig scheint die SDF-1 Freisetzung maßgeblich durch mechanische Manipulation bestimmt zu sein, wie auch schon von vorhergehenden Autoren vermutet (El Bagdadi, et al., 2019). Gegebenenfalls könnte in weiteren Versuchsreihen eine bessere Fixation des SDF-1 erreicht werden, um einem frühzeitigen Wachstumsfaktorverlust, wie er in-vivo durch die unvermeidliche konstante Manipulation wahrscheinlich wäre, entgegenzuwirken.

5.10 Fazit und weitere Forschungsanstöße

Es konnte bezüglich der Problematik der fehlenden Vaskularisierung großer Knochenersatzstrukturen und der beobachteten damit verbundenen fehlenden Nährstoffversorgung (Cheng, et al., 2018) ein Schritt in Richtung eines möglichen

Lösungsansatzes gemacht werden. Somit wurde eine der maßgeblichen Zielsetzungen dieser Forschungsarbeit erreicht. Vor der Durchführung weiterer Versuchsreihen sollten Prüfkriterien für die Quantifizierung der Angiogenese diskutiert werden. Hierzu existieren bereits weitreichende Studienergebnisse, welche als Basis zur Definition genutzt werden können (Nowak-Sliwinska, et al., 2018).

Letztlich wäre zum besseren Verständnis des Modellverhaltens auf längere Zeit die Durchführung zeitlich ausgedehnter Versuchsreihen wünschenswert. Zudem sollten größere Modelle entwickelt werden, welche die späteren Ausmaße der Knochenersatzprodukte realitätsnaher abbilden und damit auf mögliche Problemstellungen aufmerksam machen können, welche im 10mm x 10mm x 5mm Käfigmodell unberührt bleiben. So ist es möglich, dass hierbei kritische Dimensionen ausgelotet werden, über die hinaus ein Gewebeersatz durch das beschriebene Knochenersatzmaterial allein nicht möglich ist. Dies könnte unter anderen aus Problemstellungen der Zellversorgung, der mechanischen Belastbarkeit oder auch der Befüllung mit zelltragender Kollagenmatrix resultieren.

Der nächste wichtige Schritt folgte bereits mit der in-vivo Testung des Modells im Mausmodell. Die dort gezeigten Ergebnisse auf Basis der kollagengefüllten und mit Wachstumsfaktor und Zellen beladenen PLA-Käfige weisen weiter auf die Unabdingbarkeit einer adäquaten Vaskularisierung des Knochenersatzes hin (Hertweck, et al., 2018). Zusätzlich zeigen diese, gemeinsam mit den bereits hier vorgestellten Ergebnissen, dass das vorgeschlagene Konzept zur Überbrückung von langstreckigen ossären Defekten einen möglichen Weg in die Zukunft der rekonstruktiven Chirurgie nach komplexen Frakturen, Infektionen oder malignen Erkrankungen darstellen könnte.

6 Zusammenfassung

Diese Arbeit widmete sich der Vertiefung des Forschungsstands auf dem Themengebiet der Knochenersatzprodukte bei langstreckigen ossären Defekten. Es wurde der Stand der Forschung erläutert, welcher den 3D-Druck als vielversprechendes Verfahren in der Entwicklungsphase identifizierte. Weiterhin wurde ein dreidimensionales poröses Käfig-Modell aus dem Biopolymer PLA entwickelt und mittels MTT-Assay auf seine Biokompatibilität geprüft, welche nachgewiesen wurde. Gleichzeitig wurden Möglichkeiten zur Sterilisation des Werkstoffs beleuchtet und ein entwickeltes Spülprotokoll durch ein LAL-Assay auf seine Effizienz geprüft, welche bewiesen werden konnte. Es erfolgte die Befüllung der Modelle mit Zellen osteogener, vaskulärer und para-vaskulärer Reihen, welche in Kollagengel suspendiert wurden. Alle vier Zellreihen zeigten ein gutes bis sehr gutes Proliferations- und Adhäsionsverhalten innerhalb des Modells. Zusätzlich wurde der Unterschied in der Verwendung von bovinem und Rattenschwanz Kollagen untersucht. Hier zeigte sich das bovine Substrat vorteilhafter bezüglich der genannten Analysefaktoren. Die Zellkultur wurde mittels Virustransduktion von grünem und kirschroten Fluoreszenzgen für die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Somit konnte eine Beobachtung des dreidimensionalen Zellverhaltens im Käfig-Modell erfolgen, welche über eine Zeitspanne von 13 Tagen vorgenommen wurde. Die so gemachten Beobachtungen deckten sich mit den Ergebnissen der Vitalitätsprüfungen mittels Resazurin-Färbung. Weiterhin wurde eine Cokultur von osteogenen und endothelialen Zellen angelegt, welche die Beobachtung der Entstehung komplexer Zellkonglomerate erlaubte. Letztlich wurde einer Versuchsreihe von humanen Endothelzellen der Wachstumsfaktors SDF-1 beigegeben, welches zur Bildung von Röhrenstrukturen führte und auf eine mögliche Neovaskularisierung der Modelle hindeutete. Es wurde das divergierende Kulturverhalten unter Einbringung und Aufbringung der Zellen auf die Käfigmodelle geprüft, wobei die Einbringung sich, vor dem Hintergrund der erwünschten Gefäßdurchsetzung eines zukünftigen Knochenersatzmaterials, als zu bevorzugende Vorgehensweise abzeichnete. Die Ergebnisse wurden in den Kontext der aktuellen Literatur eingeordnet und Vorschläge zu weiteren Forschungsansätzen gemacht.

Insgesamt wurde die Zielsetzung der Arbeit erfüllt. Das vorgestellte Modell zur Knochenersatztherapie zeigte sich in der in-vitro Charakterisierung vielversprechend. Die weitere Prüfung im Mausmodell erfolgte bereits im Rahmen einer getrennten Arbeit. Die vorgestellten Techniken zum Modelldesign und der Optimierung der Materialvorbereitung, sowie der Zell- und Wachstumsfaktorbesetzung bilden wertvolle Erkenntnisse auf dem Gebiet der rekonstruktiven Therapie von langstreckigen Knochendefekten.

7 Literaturverzeichnis

Abula, A. et al., 2020. Reconstruction of Soft Tissue Defects and Bone Loss in the Tibia by Flap Transfer and Bone Transport by Distraction Osteogenesis: A Case Series and Our Experience. *Annals of plastic surgery*, 84(5S Suppl 3), pp. 202-207.

Alexopoulou, A. et al., 2016. Extensively drug-resistant bacteria are an independent predictive factor of mortality in 130 patients with spontaneous bacterial peritonitis or spontaneous bacteremia. *World journal of gastroenterology*, 22(15), pp. 4049-4056.

Armillotta, A., Bellotti, M. & Cavallaro, M., 2018. Warpage of FDM parts: Experimental tests and analytic model. *Robotics and Computer-Integrated Manufacturing*, Band 50, pp. 140-152.

Banerjee, M. et al., 2013. Epidemiology of extremity injuries in multiple trauma patients. *Injury*, 44(8), pp. 1015-1021.

Basarir, K., Selek, H., Yildiz, Y. & Saglik, Y., 2005. Ortopedik onkolojide kemik defektlerinin onariminda vaskularize olmayan fibula greftleri" [Nonvascularized fibular grafts in the reconstruction of bone defects in orthopedic oncology]. *Acta orthopaedica et traumatologica turcica*, 39(4), pp. 300-306.

Bertoldi, C., Zaffe, D. & Consolo, U., 2008. Polylactide/polyglycolide copolymer in bone defect healing in humans. *Biomaterials*, 29(12), pp. 1817-1823.

Bose, S., Banerjee, D., Robertson, S. & Vahabzadeh, S., 2018. Enhanced In Vivo Bone and Blood Vessel Formation by Iron Oxide and Silica Doped 3D Printed Tricalcium Phosphate Scaffold. *Annals of biomedical engineering*, 46(9), pp. 1241-1253.

Bozo, I. Y. et al., 2020. 3D Printed Gene-activated Octacalcium Phosphate Implants for Large Bone Defects Engineering. *International journal of bioprinting*, 6(3), p. 275.

Brem, H. et al., 2009. Mechanism of sustained release of vascular endothelial growth factor in accelerating experimental diabetic healing. *The Journal of investigative dermatology*, 129(9), pp. 2275-2287.

Cheng, L. et al., 2021. 3D Printing of Micro- and Nanoscale Bone Substitutes: A Review on Technical and Translational Perspectives. *International journal of nanomedicine*, Band 16, pp. 4289-4319.

Cheng, P. et al., 2018. Prevascularization promotes endogenous cell-mediated angiogenesis by upregulating the expression of fibrinogen and connective tissue growth factor in tissue-engineered bone grafts. *Stem cell research & therapy*, 9(1), p. 176.

Chimutengwende-Gordon, M., Mbogo, A., Khan, W. & Wilkes, R., 2017. Limb reconstruction after traumatic bone loss. *Injury*, 48(2), pp. 206-213.

Contar, C. M. et al., 2009. Maxillary ridge augmentation with fresh-frozen bone allografts. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 67(6), pp. 1280-1285.

Correia, C. et al., 2011. In vitro model of vascularized bone: synergizing vascular development and osteogenesis. *PloS one*, 6(12), p. e28352.

Cross, V. L. et al., 2010. Dense type I collagen matrices that support cellular remodeling and microfabrication for studies of tumor angiogenesis and vasculogenesis in vitro. *Biomaterials*, 31(33), pp. 8596-8607.

- DeCoster, T. A., Gehlert, R. J., Mikola, E. A. & Pirela-Cruz, M. A., 2004. Management of posttraumatic segmental bone defects. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 12(1), pp. 28-38.
- Dietrich, D., 2021. FGFR-gerichtete Therapie von Kopf-Hals-Karzinomen" [FGFR-targeted therapy in head and neck carcinomas] . *HNO*, 69(3), pp. 172-184.
- Dimova, I. et al., 2019. SDF-1/CXCR4 signalling is involved in blood vessel growth and remodelling by intussusception. *Journal of cellular and molecular medicine*, 23(6), pp. 3916-3926.
- Diomede, F. et al., 2018. Three-dimensional printed PLA scaffold and human gingival stem cell-derived extracellular vesicles: a new tool for bone defect repair. *Stem cell research & therapy*, 9(1), p. 104.
- Domsta, V. & Seidlitz, A., 2021. 3D-Printing of Drug-Eluting Implants: An Overview of the Current Developments Described in the Literature. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(13), p. 4066.
- El Bagdadi, K. et al., 2019. Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). *European journal of trauma and emergency surgery : official publication of the European Trauma Society*, 45(3), p. 467–479.
- Elter, P. et al., 2011. The influence of topographic microstructures on the initial adhesion of L929 fibroblasts studied by single-cell force spectroscopy. *European biophysics journal : EBJ*, 40(3), pp. 317-327.
- Fairag, R. et al., 2019. Three-Dimensional Printed Polylactic Acid Scaffolds Promote Bone-like Matrix Deposition in Vitro. *ACS applied materials & interfaces*, Mai, 11(17), pp. 15306-15315.
- Ferreira, A. M., Gentile, P., Chiono, V. & Ciardelli, G., 2012. Collagen for bone tissue regeneration. *Acta biomaterialia*, 8(9), pp. 3191-3200.
- Flaig, I. et al., 2020. In Vivo Analysis of the Biocompatibility and Immune Response of Jellyfish Collagen Scaffolds and its Suitability for Bone Regeneration. *International journal of molecular sciences*, 21(12), p. 4518.
- García-Gareta, E., Coathup, M. J. & Blunn, G. W., 2015. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone*, Band 81, pp. 112-121.
- Genova, T. et al., 2020. Advances on Bone Substitutes through 3D Bioprinting. *International journal of molecular sciences*, 21(19), p. 7012.
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S. & Kempson, I., 2021. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International journal of molecular sciences*, 22(23), p. 12827.
- Gifre-Renom, L., Daems, M., Lutun, A. & Jones, E., 2022. Organ-Specific Endothelial Cell Differentiation and Impact of Microenvironmental Cues on Endothelial Heterogeneity. *International journal of molecular sciences*, 23(3), p. 1477.
- Goff, T., Kanakaris, N. K. & Giannoudis, P. V., 2013. Use of bone graft substitutes in the management of tibial plateau fractures. *Injury*, 44(1), pp. 86-94.

- Grela, E., Ząbek, A. & Grabowiecka, A., 2015. Interferences in the Optimization of the MTT Assay for Viability Estimation of *Proteus mirabilis*. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 7(4), pp. 159-167.
- Gurevich, D. B., David, D. T., Sundararaman, A. & Patel, J., 2021. Endothelial Heterogeneity in Development and Wound Healing. *Cells*, 10(9), p. 2338.
- Hall, M. S. et al., 2016. Fibrous nonlinear elasticity enables positive mechanical feedback between cells and ECMs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(49), pp. 14043-14048.
- Han, C. et al., 2017. Electrophoretic Deposition of Gentamicin-Loaded Silk Fibroin Coatings on 3D-Printed Porous Cobalt-Chromium-Molybdenum Bone Substitutes to Prevent Orthopedic Implant Infections. *Biomacromolecules*, 18(11), pp. 3776-3787.
- Hartemann-Heurtier, A. & Senneville, E., 2008. Diabetic foot osteomyelitis. *Diabetes & metabolism*, 34(2), p. 87–95.
- Hertweck, J. et al., 2018. CD34+ cells seeded in collagen scaffolds promote bone formation in a mouse calvarial defect model. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 106(4), p. 1505–1516.
- Hetherington, V. J. et al., 2005. Immunologic testing of xeno-derived osteochondral grafts using peripheral blood mononuclear cells from healthy human donors. *BMC musculoskeletal disorders*, 6(36).
- Huang, G., Pan, S. T. & Qiu, J. X., 2021. The Clinical Application of Porous Tantalum and Its New Development for Bone Tissue Engineering. *Materials (Basel, Switzerland)*, 14(10), p. 2647.
- Jafari, M. e. a., 2017. Polymeric scaffolds in tissue engineering: a literature review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, 105B(2), pp. 431-459.
- Josephs-Spaulding, J. & Singh, O. V., 2021. Medical Device Sterilization and Reprocessing in the Era of Multidrug-Resistant (MDR) Bacteria: Issues and Regulatory Concepts. *Frontiers in medical technology*, Band 2, p. 587352.
- Kafle, A. et al., 2021. 3D/4D Printing of Polymers: Fused Deposition Modelling (FDM), Selective Laser Sintering (SLS), and Stereolithography (SLA). *Polymers*, 13(18), p. 3101.
- Kang, H. W. et al., 2016. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nature biotechnology*, 34(3), pp. 312-319.
- Karalashvili, L. et al., 2018. Bone grafts for reconstruction of bone defects (Review). *Georgian medical news*, Issue 282, p. 44–49.
- Kempen, D. H. et al., 2010. Growth factor interactions in bone regeneration. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 16(6), p. 551–566.
- Klimaj, S. D., Licon Munoz, Y., Del Toro, K. & Hines, W. C., 2020. A high-throughput imaging and quantification pipeline for the EVOS imaging platform. *PloS one*, 15(8), p. e0236397.
- Kocherova, I. et al., 2019. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Co-Culture with Osteogenic Cells: From Molecular Communication to Engineering Prevascularised Bone Grafts. *Journal of clinical medicine*, 8(10), p. 1602.
- Korn, P. et al., 2020. 3D Printing of Bone Grafts for Cleft Alveolar Osteoplasty - In vivo Evaluation in a Preclinical Model. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, Band 8, p. 217.

- Kramer, A. et al., 2016. Antimikrobielle und antiinfektiöse Maßnahmen. *Krankenhaus- und Praxishygiene*, p. 9–162.
- Kübler, N. et al., 1998. Klinischer Einsatz osteoinduktiver Implantate in der kraniofazialen Chirurgie [Clinical application of osteoinductive implants in craniofacial surgery]. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*, 2(1), pp. 32-36.
- Kuttappan, S., Mathew, D. & Nair, M. B., 2016. Biomimetic composite scaffolds containing bioceramics and collagen/gelatin for bone tissue engineering - A mini review. *International journal of biological macromolecules*, 93(B), pp. 1390-1401.
- Lauer, A. et al., 2020. Biofabrication of SDF-1 Functionalized 3D-Printed Cell-Free Scaffolds for Bone Tissue Regeneration. *International journal of molecular sciences*, 21(6), p. 2175.
- Lawal, Y. Z. et al., 2011. Use of non-vascularized autologous fibula strut graft in the treatment of segmental bone loss. *Annals of African medicine*, 10(1), pp. 25-28.
- Lee, E. J., Jain, M. & Alimperti, S., 2021. Bone Microvasculature: Stimulus for Tissue Function and Regeneration. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 27(4), pp. 313-329.
- Leung, H. B., Fok, M. W., Chow, L. C. & Yen, C. H., 2010. Cost comparison of femoral head banking versus bone substitutes. *Journal of orthopaedic surgery (Hong Kong)*, 18(1), pp. 50-54.
- Liu, Y., Lim, J. & Teoh, S. H., 2013. Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. *Biotechnology Advances*, 31(5), pp. 688-705.
- Liu, Y., Luo, D. & Wang, T., 2016. Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone Tissue Engineering. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 12(34), pp. 4611-4632.
- Long, B. et al., 2012. *Xenotransplantation*, 19(2), pp. 122-132.
- Łopianiak, I. & Butruk-Raszeja, B. A., 2020. Evaluation of Sterilization/Disinfection Methods of Fibrous Polyurethane Scaffolds Designed for Tissue Engineering Applications. *International journal of molecular sciences*, 21(21), p. 8092.
- Martino, M. M., Briquez, P. S., Maruyama, K. & Hubbell, J. A., 2015. Extracellular matrix-inspired growth factor delivery systems for bone regeneration. *Advanced drug delivery reviews*, Band 94, p. 41–52.
- Martins, J. A. et al., 2020. Polydioxanone implants: A systematic review on safety and performance in patients. *Journal of biomaterials applications*, 34(7), pp. 902-916.
- Mattes, B. & Scholpp, S., 2018. Emerging role of contact-mediated cell communication in tissue development and diseases. *Histochemistry and cell biology*, 150(5), pp. 431-442.
- Meyer, M., 2019. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. *Biomedical engineering online*, 18(1), p. 24.
- Migliorini, F. et al., 2021. Strategies for large bone defect reconstruction after trauma, infections or tumour excision: a comprehensive review of the literature. *European journal of medical research*, 26(1), p. 118.
- Miller, C. P. & Chiodo, C. P., 2016. Autologous Bone Graft in Foot and Ankle Surgery. *Foot and ankle clinics*, 21(4), pp. 825-837.
- Moccia, F. et al., 2019. Endothelial Ca²⁺ Signaling, Angiogenesis and Vasculogenesis: just What It Takes to Make a Blood Vessel. *International journal of molecular sciences*, 20(16), p. 3962.

- Montgomery, D. M. & Moed, B. R., 1989. Cancellous bone donor site regeneration. *Journal of orthopaedic trauma*, 3(4), pp. 290-294.
- Myeroff, C. & Archdeacon, M., 2011. Autogenous bone graft: donor sites and techniques. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 93(23), pp. 2227-2236.
- Nadorf, J. et al., 2017. Influence of implant length and bone defect situation on primary stability after distal femoral replacement in vitro. *The Knee*, 24(5), p. 1016–1024.
- Nauth, A., Ristevski, B., Li, R. & Schemitsch, E. H., 2011. Growth factors and bone regeneration: how much bone can we expect?. *Injury*, 42(6), p. 574–579.
- Nevins, M. et al., 2014. The efficacy of mineralized allograft cortical and cancellous chips in maxillary sinus augmentations. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*, 34(6), pp. 789-793.
- Nguyen, M. K. & Alsberg, E., 2014. Bioactive factor delivery strategies from engineered polymer hydrogels for therapeutic medicine. *Progress in polymer science*, 39(7), pp. 1236-1265.
- Nowak-Sliwinska, P. et al., 2018. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis*, 21(3), p. 425–532.
- Nusselt, T. e. a., 2014. CERAMENT treatment of fracture defects (CERTiFy): protocol for a prospective, multicenter, randomized study investigating the use of CERAMENT™ BONE VOID FILLER in tibial plateau fractures. *Trials*, 15(75).
- Oakes, D. A. & Cabanela, M. E., 2006. Impaction bone grafting for revision hip arthroplasty: biology and clinical applications. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 14(11), pp. 620-628.
- Okamoto, M. & John, B., 2013. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. *Progress in Polymer Science*, 38(10-11), pp. 1487-1503.
- Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A. & Maffulli, N., 2014. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of orthopaedic surgery and research*, 9(1).
- Paradiso, F. et al., 2019. Marine Collagen Substrates for 2D and 3D Ovarian Cancer Cell Systems. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, Band 7, p. 343.
- Parikh, S. N., 2002. Bone graft substitutes: past, present, future. *Journal of postgraduate medicine*, 48(2), pp. 142-148.
- Park, J. B., 2011. The use of hydrogels in bone-tissue engineering. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, 16(1), pp. 115-118.
- Pérez Davila, S. et al., 2021. How to Sterilize Poly(lactic Acid) Based Medical Devices?. *Polymers*, 13(13), p. 2115.
- Place, T. L., Domann, F. E. & Case, A. J., 2017. Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated problem in basic and translational research. *Free radical biology & medicine*, Band 113, pp. 311-322.
- Raja, N. & Yun, H. S., 2016. A simultaneous 3D printing process for the fabrication of bioceramic and cell-laden hydrogel core/shell scaffolds with potential application in bone tissue regeneration. *Journal of materials chemistry. B*, 4(27), p. 4707–4716.

- Ramasamy, S. K., Kusumbe, A. P. & Adams, R. H., 2015. Regulation of tissue morphogenesis by endothelial cell-derived signals. *Trends in cell biology*, 25(3), pp. 148-157.
- Renz, N. e. a., 2017. Osteosynthesis-associated infections : Epidemiology, definition and diagnosis. *Der Unfallchirurg*, Juni, 120(6), pp. 454-460.
- Richter, J., Schulze, W. & Muhr, G., 2000. Diaphysäre Femurpseudarthrosen--nur ein technisches Problem? [Diaphyseal femur pseudarthroses--only a technical problem?]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin*, 71(9), p. 1098–1106.
- Ritz, U. et al., 2017. A New Bone Substitute Developed from 3D-Prints of Polylactide (PLA) Loaded with Collagen I: An In Vitro Study. *International journal of molecular sciences*, 18(12), p. 2569.
- Rizzuto, R. et al., 1995. Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. *Current biology : CB*, 5(6), pp. 635-642.
- Ryan, A. J. et al., 2015. Effect of different hydroxyapatite incorporation methods on the structural and biological properties of porous collagen scaffolds for bone repair. *Journal of anatomy*, 227(6), pp. 732-745.
- Sarkar, N. & Bose, S., 2020. Controlled release of soy isoflavones from multifunctional 3D printed bone tissue engineering scaffolds. *Acta biomaterialia*, Band 114, pp. 407-420.
- Sarkar, S. K. & Lee, B. T., 2015. Hard tissue regeneration using bone substitutes: an update on innovations in materials. *The Korean journal of internal medicine*, 30(3), pp. 279-293.
- Scalea, J., Hanecamp, I., Robson, S. C. & Yamada, K., 2012. T-cell-mediated immunological barriers to xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 19(1), pp. 23-30.
- Schroepfer, M. et al., 2020. Gas-Phase Fluorination on PLA Improves Cell Adhesion and Spreading. *ACS omega*, 5(10), pp. 5498-5507.
- Shahabipour, F. et al., 2020. Key components of engineering vascularized 3-dimensional bioprinted bone constructs. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, Band 216 , pp. 57-76.
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A. & Tsien, R. Y., 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature methods*, 2(12), pp. 905-909.
- Shinde, A. et al., 2021. A Review of Single-Cell Adhesion Force Kinetics and Applications. *Cells*, 10(3), p. 577.
- Söhling, N. et al., 2020. 3D-Printing of Hierarchically Designed and Osteoconductive Bone Tissue Engineering Scaffolds. *Materials (Basel, Switzerland)*, 13(8), p. 1836.
- Solakoglu, Ö., Heydecke, G., Amiri, N. & Anitua, E., 2020. The use of plasma rich in growth factors (PRGF) in guided tissue regeneration and guided bone regeneration. A review of histological, immunohistochemical, histomorphometrical, radiological and clinical results in humans. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*, Band 231, p. 151528.
- Stepanenko, O. V., Verkhusha, V. V., Kuznetsova, I. M. & Turoverov, K. K., 2007. [Fluorescent proteins: physical-chemical properties and application in cell biology]. *Tsitologija*, 49(5), pp. 395-420.
- Stürmer, K. M., 1996. Pathophysiologie der gestörten Knochenheilung [Pathophysiology of disrupted bone healing]. *Der Orthopade*, 25(5), p. 386–393.

- Sun, X. et al., 2013. Modeling vascularized bone regeneration within a porous biodegradable CaP scaffold loaded with growth factors. *Biomaterials*, 34(21), pp. 4971-4981.
- Swetha, M. et al., 2010. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, 47(1), p. 1–4.
- Tamamis, P. & Floudas, C. A., 2014. Elucidating a key component of cancer metastasis: CXCL12 (SDF-1 α) binding to CXCR4. *Journal of chemical information and modeling*, 54(4), pp. 1174-1188.
- Tamura, H., Reich, J. & Nagaoka, I., 2021. Outstanding Contributions of LAL Technology to Pharmaceutical and Medical Science: Review of Methods, Progress, Challenges, and Future Perspectives in Early Detection and Management of Bacterial Infections and Invasive Fungal Diseases. *Biomedicines*, 9(5), p. 536.
- Tellisi, N., Ashammakhi, N. A., Billi, F. & Kaarela, O., 2018. Three Dimensional Printed Bone Implants in the Clinic. *The Journal of craniofacial surgery*, 29(8), pp. 2363-2367.
- Thein-Han, W. & Xu, H. H., 2013. Prevascularization of a gas-foaming macroporous calcium phosphate cement scaffold via coculture of human umbilical vein endothelial cells and osteoblasts. *Tissue engineering. Part A*, 19(15-16), pp. 1675-1685.
- Tillman, B. N. et al., 2016. Fibroblast growth factor family aberrations as a putative driver of head and neck squamous cell carcinoma in an epidemiologically low-risk patient as defined by targeted sequencing. *Head & neck*, 38(1), p. E1646–E1652.
- Trajkovic, K., Valdez, C., Ysselstein, D. & Krainc, D., 2019. Fluctuations in cell density alter protein markers of multiple cellular compartments, confounding experimental outcomes. *PLoS one*, 14(2), p. e211727.
- Ungai-Salánki, R. et al., 2019. A practical review on the measurement tools for cellular adhesion force. *Advances in colloid and interface science*, Band 269, pp. 309-333.
- van Tonder, A., Joubert, A. M. & Cromarty, A. D., 2015. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC research notes*, Band 8, p. 47.
- Vidal, L. et al., 2020. Reconstruction of Large Skeletal Defects: Current Clinical Therapeutic Strategies and Future Directions Using 3D Printing. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, Band 8, p. 61.
- Vlasova-St Louis, I. & Bohjanen, P. R., 2017. Post-transcriptional regulation of cytokine and growth factor signaling in cancer. *Cytokine & growth factor reviews*, Band 33 , pp. 83-93.
- Wang, K., Lin, R. Z. & Melero-Martin, J. M., 2019. Bioengineering human vascular networks: trends and directions in endothelial and perivascular cell sources. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 76(3), pp. 421-439.
- Wang, M. et al., 2016. Cold atmospheric plasma (CAP) surface nanomodified 3D printed polylactic acid (PLA) scaffolds for bone regeneration. *Acta biomaterialia*, Band 46, p. 256–265.
- Watson, J. T., 2006. Distraction osteogenesis. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 14(10), pp. 168-174.
- Wei, S. et al., 2020. Biodegradable materials for bone defect repair. *Military Medical Research*, 7(1), p. 54.

- Westberry, D. E., Carpenter, A. M., Tisch, J. & Wack, L. I., 2018. Amputation Outcomes in Congenital Pseudarthrosis of the Tibia. *Journal of pediatric orthopedics*, 38(8), p. e475–e481.
- Xiao, W. et al., 2017. Tough and strong porous bioactive glass-PLA composites for structural bone repair. *Journal of materials science*, 52(15), pp. 9039-9054.
- Yang, X. et al., 2010. Clinical and radiographic outcomes of the treatment of adolescent idiopathic scoliosis with segmental pedicle screws and combined local autograft and allograft bone for spinal fusion: a retrospective case series. *BMC musculoskeletal disorders*, 11(159).
- Yan, Y. et al., 2019. Vascularized 3D printed scaffolds for promoting bone regeneration. *Biomaterials*, Band 190-191, pp. 97-110.
- Yeung, P., Cheng, K. H., Yan, C. H. & Chan, B. P., 2019. Collagen microsphere based 3D culture system for human osteoarthritis chondrocytes (hOACs). *Scientific reports*, 9(1), p. 12453.
- Yu, H. et al., 2009. Improved tissue-engineered bone regeneration by endothelial cell mediated vascularization. *Biomaterials*, 30(4), p. 508–517.
- Zheng, C. et al., 2021. 3D-printed HA15-loaded β -Tricalcium Phosphate/Poly (Lactic-co-glycolic acid) Bone Tissue Scaffold Promotes Bone Regeneration in Rabbit Radial Defects. *International journal of bioprinting*, 7(1), p. 317.
- Zheng, K. et al., 2019. Outcome of segmental prosthesis reconstruction for diaphyseal bone tumors: a multi-center retrospective study. *BMC cancer*, 19(1), p. 638.
- Zhu, Y. et al., 2014. Pathoanatomy and incidence of the posterolateral fractures in bicondylar tibial plateau fractures: a clinical computed tomography-based measurement and the associated biomechanical model simulation. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 134(10), pp. 1369-1380.
- Zimmer, M., 2002. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chemical reviews*, 102(3), pp. 759-781.