

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

Untersuchung und Charakterisierung des Einflusses von 3D gedruckten Plättchen
aus Polylactid mit unterschiedlichen Modifikationen auf primäre Zellen

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

Vorgelegt von

Simon Robert Cichos
Aus Berlin

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachterin:

2. Gutachterin:

Tag der Promotion: 29. Oktober 2024

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
2 Literaturdiskussion.....	2
2.1 Knochen und Frakturen.....	2
2.1.1 Der menschliche Knochen.....	2
2.1.2 Prozess der Knochenheilung.....	2
2.1.3 Osteoblasten.....	3
2.1.4 Endothelzellen.....	5
2.1.5 Therapeutische Verfahren.....	7
2.2 Tissue Engineering.....	9
2.2.1 Definition.....	9
2.2.2 3D-Druck.....	9
2.2.3 Polylactid.....	10
2.2.4 Bioglas.....	10
2.2.5 Chitosan.....	11
3 Ziele.....	12
4 Material und Methoden.....	13
4.1 PLA-Bioglas.....	13
4.2 PLA-Chitosan.....	14
4.3 Versuchsdurchführung.....	14
4.3.1 Zellkultur.....	14
4.3.2 Proliferationsassay.....	18
4.3.3 Ribonukleinsäuren - Isolierung (RNA – Isolierung).....	19
4.3.4 Spektralphotometrische Messung.....	19
4.3.5 Reverse Transkription.....	19
4.3.6 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	20
4.3.7 Matrigel®.....	21

4.3.8	Chorioallantoic-Membran-Assay (CAM – Assay)	23
4.3.9	Zytotoxizitätsassay	23
4.4	Auswertung und Statistik	24
5	Ergebnisse	25
5.1	PLA-Bioglas	25
5.1.1	Proliferationsassay	25
5.1.2	qPCR	27
5.1.3	Matrigel®	30
5.1.4	CAM-Assay	34
5.2	Chitosan	38
5.2.1	Proliferationsassay	38
5.2.2	qPCR	40
5.2.3	Zytotoxizitätsassay	42
6	Diskussion	43
6.1	Bioglas	43
6.1.1	Proliferationsassay	43
6.1.2	qPCR	44
6.1.3	Matrigel®-Assay	45
6.1.4	Chorioallantoic-Membran-Assay	46
6.2	Chitosan	49
6.2.1	Proliferationsassay	49
6.2.2	qPCR	50
6.2.3	Zytotoxizitätsassay	50
6.3	Fehlerdiskussion	51
7	Zusammenfassung und Ausblick	53
8	Literaturverzeichnis	55
9	Materialienliste	63
9.1	Gerätschaften	63
9.2	Software	64
9.3	Instrumente	64

9.4	Reagenzien.....	64
9.5	Verbrauchsmaterialien.....	66
10	Anhang.....	68
10.1	Publikation im International Journal of Bioprinting.....	68
11	Danksagung.....	82
12	Tabellarischer Lebenslauf.....	83

Abkürzungsverzeichnis

3D-Druck	dreidimensionaler-Druck
BG	Bioglas
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CA	Chitosan-Acetat
CAM	Chorioallantois Membran
CD31	Cluster of Differentiation 31
CT	Chitosan
CTK	Chitosan-Komplex
CTS	Chitosan-Salicylat
d1	Tag 1
d4	Tag 4
d7	Tag 7
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EBM-2®	Endothelial Cell Basal Medium-2
EGM-2™	Endothelial Cell Growth Medium-2
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	Fetales Kälber Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Gol	Gene of Interest
HA	Hydroxyapatit
hOB	Humane Osteoblasten
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
i. Vgl.	Im Vergleich
KDR	Kinase-insert-Domain-Receptor
microRNAs	micro-ribonukleinsäuren
min	Minute
MSC	mesenchymal stemcell
nb	number
OPN	Osteopontin
OSG	Oberes Sprunggelenk
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PGI2	Prostaglandin I2
PLA	Polylactid
PS	Penicillin+Streptomycin Solution
RNA	Ribonukleinsäure
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
SPARC	secreted protein acidic and rich in cysteine
u.a.	unter anderem
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR2	vascular endothelial growth factor-receptor 2
vWF	von-Willebrand Faktor
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verlauf der Frakturheilung (Quelle: (2)).....	3
Abbildung 2: Schema der Remodellierung des Knochengewebes (Quelle: (3)).....	4
Abbildung 3: Vaskularisierung bei der Osteosynthese (Quelle: (3))	7
Abbildung 4: PLA-Plättchen mit unterschiedlichen Bioglas-Konzentrationen; Maße: \varnothing 0,5 cm	13
Abbildung 5: PLA-Plättchen mit unterschiedlichen Chitosan-Modifikationen; Maße: \varnothing 1,5 cm	14
Abbildung 6: Schematische Anordnung der Bioglas-Plättchen in 96-Well Platte.....	16
Abbildung 7: „additives Medium“ - PLA + 0% Bioglas - Cages in Medium für 48 Stunden	22
Abbildung 8: Aufnahme eines Hühnereis mit Präparation der CAM und aufliegendem Bioglas-Plättchen	23
Abbildung 9: Inkubation PLA + Chitosan-Plättchen in 1 ml Medium	24
Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der HUVECs an Tag 4 des Proliferationsassays. Skalierung: 2mm.	25
Abbildung 11: Prozentuale Ergebnisdarstellung des Proliferationsassays der HUVECs mit Bioglas im Vergleich zu den Zellen des reinen Polylactids an Tag 1(d1), Tag 4(d4) und Tag 7(d7); Orange Linie = PLA pur (100%).....	26
Abbildung 12: Proliferationsassay (alamarBlue™) von HUVECs auf PLA-BG Plättchen mit unterschiedlichen Modifikationen. Dargestellt ist die Menge lebensfähiger Zellen anhand der Fluoreszenzintensität an Tag 1 und Tag 4. Mann-Whitney U Test zeigt signifikante Unterschiede (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$; **** $P < 0.001$).....	27
Abbildung 13: Genexpression von CD31 in den Endothelzellen nach Kultur auf PLA-BG Plättchen an Tag 1(A) und Tag 4(B)	28
Abbildung 14: Genexpression von KDR in den Endothelzellen nach Kultur auf PLA-BG Plättchen an Tag 1(A) und Tag 4(B)	29
Abbildung 15: Genexpression von vWF in den Endothelzellen nach Kultur auf PLA-BG Plättchen an Tag 1(A) und Tag 4(B)	29
Abbildung 16: Genexpression von HUVECs auf PLA + 10%BG und PLA + 20%BG Plättchen an Tag 1 und Tag 4. Mann-Whitney U Test zeigt signifikante Unterschiede (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$; **** $P < 0.001$). Schwarze Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen PLA + 10%BG und PLA + 20%BG. Blaue Sterne zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zum reinen PLA (blaue Linie = 1).....	30
Abbildung 17: Angiogenese-Formationen der HUVECs beim Matrigel®-Versuch (PLA + 10% BG)	31

Abbildung 18: Matrigel® - Analyse der Abb. 17 mit ImageJ - Angiogenese Analyzer; Weißer Pfeil: Junction (Rote Punkte), Schwarzer Pfeil: Segment (Rosa Linien als Verbindung zwischen den Junctions)	31
Abbildung 19: Matrigel® - Auswertung (A: nb. of junctions, B: nb. of segments, C: total length). Alle drei Analysen zeigen eine erhöhte Angiogenese der HUVECs bei steigendem Bioglas-Anteil. Mann-Whitney U Test zeigen signifikante Unterschiede (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005; ****P < 0.001).	33
Abbildung 20: CAM – Assay. Beispielhafte Darstellung von PLA pur an Tag 7.....	34
Abbildung 21: CAM – Assay. Beispielhafte Darstellung von PLA + 10%BG an Tag 7	34
Abbildung 22: CAM – Assay. Beispielhafte Darstellung von PLA + 20%BG an Tag 7	35
Abbildung 23: CAM – Assay. PLA + 10%BG an Tag 7. Skalierung: 2mm (A) und 500µm (B).	35
Abbildung 24: CAM – Assay. PLA + 20%BG an Tag 3(A) und Tag 5(B)	36
Abbildung 25: CAM-Auswertung: Vergleich der Gefäßdichte (d0 + d7). Mann-Whitney U Test zeigt signifikante Unterschiede (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005; ****p < 0.001).....	37
Abbildung 26: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der hOBs auf PLA-Plättchen mit unterschiedlichen Chitosan-Modifikationen an Tag 7. Skalierung 2 mm.....	38
Abbildung 27: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der hOBs auf PLA-Plättchen mit unterschiedlichen Chitosan-Modifikationen an Tag 7. Skalierung: 2mm.....	39
Abbildung 28: Prozentualer Vergleich der Proliferation der hOBs auf den Chitosan-Modifikationen und auf reinem PLA (Orange Linie bei 100%) an Tag 1 (d1), Tag 4 (d4) und Tag 7 (d7).....	39
Abbildung 29: Genexpression von OPN in humanen Osteoblasten nach Kultur auf PLA-Chitosan Plättchen an Tag 1(A) und Tag 4(B)	40
Abbildung 30: Genexpression von RUNX2 in humanen Osteoblasten nach Kultur auf PLA-Chitosan Plättchen an Tag 1(A) und Tag 4(B)	41
Abbildung 31: Genexpression von SPARC in humanen Osteoblasten nach Kultur auf PLA-Chitosan Plättchen an Tag 1(A) und Tag 4(B)	41
Abbildung 32: Zytotoxizitätsassay mit Fibroblasten im Chitosan-Medium und Vergleich zum reinen PLA; Orange Linie: PLA pur 100%.....	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ansätze für die Reverse Transkription	19
Tabelle 2: Programm für die reverse Transkription	20
Tabelle 3: Primer Mix	20
Tabelle 4: Softwareeinstellungen qPCR.....	21

1 Einleitung

Frakturen sind häufige Krankheitsbilder die täglich in Kliniken behandelt werden. 2019 lag in Deutschland die Inzidenz von Frakturen bei 1014,4 pro 100.000 Einwohnern (1). Dabei sind sie nicht auf eine Altersklasse begrenzt, sondern reichen von Kleinkindern bis hin zu Senioren. Frakturen zeichnen sich unter anderem durch Schwellungen, Schmerzen und dadurch resultierende Bewegungseinschränkungen aus. Im klinischen Alltag kommen dabei unkomplizierte, sehr kleine Frakturen bis hin zu hochkomplexen mehrfragmentären Frakturen vor. Die therapeutischen Optionen bestehen in der Regel aus zwei Verfahren: konservativ mit Gipsanlage oder operative Rekonstruktion der Fraktur und Fixierung mittels verschiedener Verfahren. Bei der operativen Variante werden in der Regel Metallimplantate genutzt, die je nach Alter des Patienten und Lokalisation entweder ein Jahr oder dauerhaft im Patienten verbleiben. Die Notwendigkeit zur Entfernung dieser Implantate ist ein Ausgangspunkt für diese Arbeit. Es ist eine zweite Operation nötig, die mit diversen Risiken einhergeht. Um das langfristige Ziel, die Vermeidung dieser zweiten Operation, zu erreichen, ist die Erforschung von degradierbaren Biomaterialien, die die gleichen Funktionen wie die herkömmlichen Implantate erfüllen, notwendig.

Das Tissue Engineering ist ein Fachgebiet, das Alternativen bietet. Es befasst sich damit Gewebe und biokompatible Materialien so zu verknüpfen, dass sie in den menschlichen Körper eingebracht werden können. Das Ziel ist es dabei zum Beispiel (z.B.) zerstörtes Gewebe zu ersetzen, Hilfestellung bei der Bildung von neuem Gewebe zu leisten oder einfach mechanische Unterstützung zu gewähren bis der Körper die Heilung abgeschlossen hat. Mithilfe des dreidimensionalen Drucks (3D-Druck) ist es nicht nur möglich Kunststoffe zu drucken, sondern auch Zellen während des Druckes in ein Kunststoffgerüst einzubetten, das sogenannte Bioprinting.

In dieser Arbeit wurden mittels 3D-Druck hergestellte Plättchen verwendet. Hauptbestandteil dieser ist Polylactid, das mit unterschiedlichen Konzentrationen an Bioglas oder Chitosan versetzt wurde. Diese 3D-Konstrukte wurden mit verschiedenen Zellen zusammengebracht, unter anderem mit Osteoblasten und Endothelzellen. In Bezug auf Frakturen sind das die wichtigsten ausgereiften Zellen, die an der Frakturheilung beteiligt sind. In unterschiedlichen Versuchen wurden die Zellen charakterisiert und untersucht welche Auswirkungen das Material auf die Proliferation und Differenzierung der Zellen hat. Wenn die Zellen auf alternativen Materialien wachsen und ihre zellspezifische Funktion ausführen können, wird davon ausgegangen, dass diese Stoffe grundsätzlich als geeignet gelten (2).

2 Literaturdiskussion

2.1 Knochen und Frakturen

2.1.1 Der menschliche Knochen

Der menschliche Knochen dient nicht nur als Stützgerüst, sondern auch als Ursprungs- und Ansatzfläche für Muskeln, Sehnen und Bändern und außerdem dem Schutz innerer Organe. Er zeichnet sich durch seine hohe Stabilität und Härte aus (3). Zudem befindet sich im inneren des Knochens das Knochenmark, welches für die Blutbildung verantwortlich ist und auch als Fettreservoir dient. Der Knochen ist auch an der Kalziumhomöostase und der Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen beteiligt (4, 5). Das Knochengewebe besteht aus mineralisierter Extrazellulärmatrix (EZM), welche aus einem organischen und einem anorganischen Teil besteht. Dabei macht anorganische Knochenmasse mit 70% den größeren Anteil aus. Diese besteht hauptsächlich aus Hydroxylapatit (99%)(3). Der organische Teil wiederum, der durch Osteoblasten produziert wird, besteht aus 90% Kollagen Typ I. Der Rest besteht aus Proteoglykanen, Osteopontin, Osteonektin und weiteren Proteinen (2). Die Zelltypen, die für den Auf- und Abbau der Knochenmatrix verantwortlich sind, sind die Osteoblasten und Osteoklasten. Das Gleichgewicht dieser beiden Zellreihen sorgt beim Gesunden für die Balance der Knochenmasse (3). Vor allem die Osteoblasten, die Knochenbildungszellen, spielen bei Frakturen des Knochens eine große Rolle.

2.1.2 Prozess der Knochenheilung

Die Knochenheilung wird in verschiedene Abschnitte eingeteilt: die primäre- und die sekundäre Knochenheilung (6, 7). Von der primären-, oder auch direkten Knochenheilung wird gesprochen, wenn die Frakturrenden direkt aneinander adaptiert sind und absoluter Stabilität unterliegen. Die Heilung des Knochens und der Kortikalis funktioniert dann ohne Kallusbildung (3, 8). Aufgrund dessen das operativ nur selten so präzise gelingt, findet dort vor allem die sekundäre- oder indirekte Knochenheilung statt. Unmittelbar als Folge der Fraktur und der damit zusammenhängenden Zerstörung von kleinen Gefäßen und der Freilegung des Knochenmarks kommt es zum sogenannten Frakturhämatom. Aus dieser Gewebsverletzung folgt eine Entzündungsreaktion, die das Einwandern von Leukozyten, Granulozyten und Monozyten begünstigt. Die migrierten Zellen setzen dann verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren frei (9, 10). In Abbildung 1 sind der Verlauf und die Phasen der Frakturheilung dargestellt. In der ersten Phase der Knochenheilung hat sich das Hämatom bereits nach wenigen Tagen organisiert und es hat sich Granulationsgewebe gebildet. Das Granulationsgewebe ist die Grundlage für den weiteren Heilungsprozess, in dem zunächst mesenchymale Stammzellen (MSCs) sowohl aus dem umliegenden Gewebe als auch direkt aus dem Periost rekrutiert werden (10). Die periostalen Stammzellen werden direkt zu

Osteoblasten differenziert und produzieren neue Knochenmatrix, die auch als harter Kallus bezeichnet wird. Die mesenchymalen Vorläuferzellen aus dem Gewebe entwickeln sich in der zweiten Phase der Knochenheilung zu Fibroblasten, Endothelzellen und auch zu Chondrozyten, die dann wiederum bei der enchondralen Ossifikation den weichen Kallus bilden (8, 11). Die nötige Blutversorgung des weichen Kallus erfolgt durch die Einsprossung von neugebildeten Blutgefäßen durch die Endothelzellen. In der dritten Phase kommt es zum Remodelling. Dort werden diese weichen Knochenstrukturen zu hartem Kallus umgebaut bis der Ausgangszustand der ursprünglichen Knochenstruktur erreicht ist (12, 13).

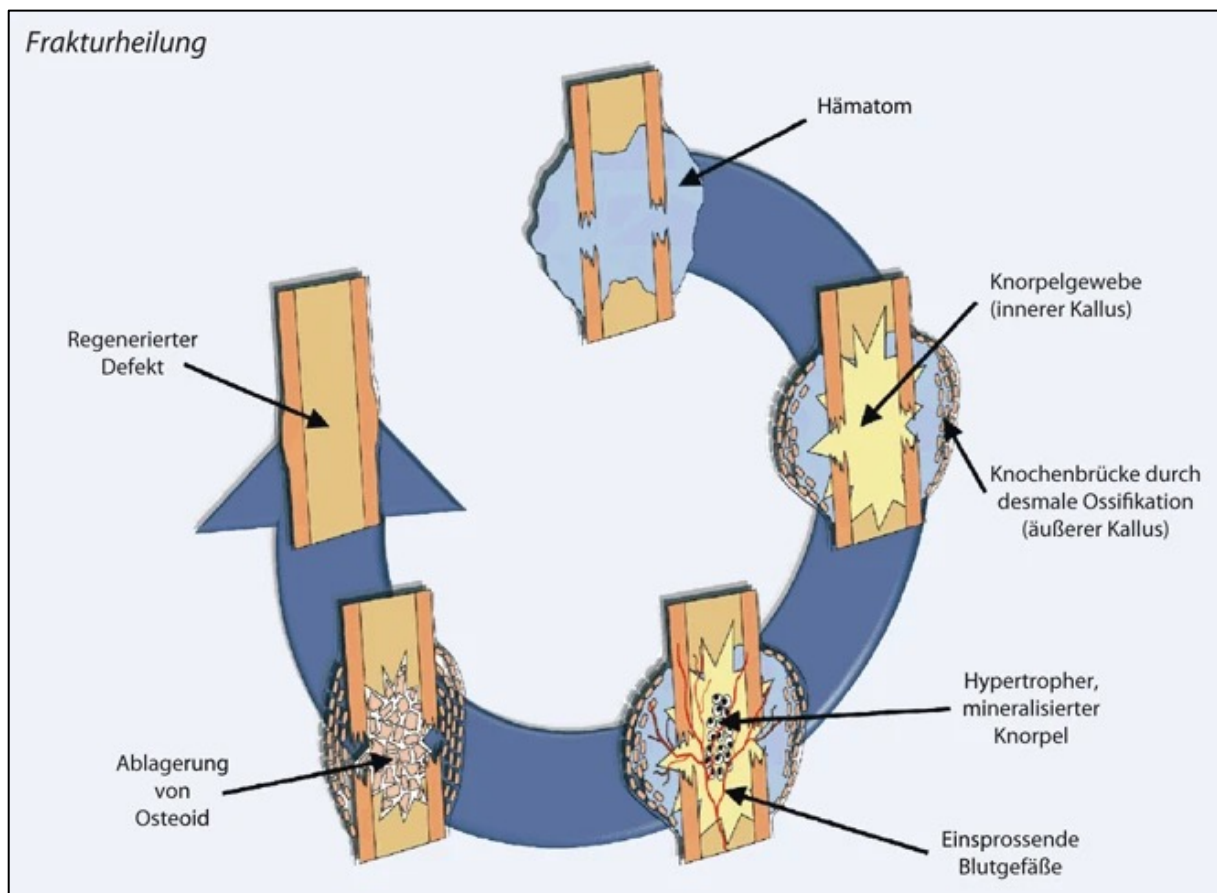


Abbildung 1: Verlauf der Frakturheilung (Quelle: (2))

2.1.3 Osteoblasten

Einer von 3 Zelltypen des Knochens sind die Osteoblasten. Sie sind hauptsächlich für den Aufbau von Knochenmasse verantwortlich und damit essenziell bei der Heilung von Frakturen. Durch die Produktion von Proteinen und Wachstumsfaktoren haben sie einen wesentlichen Anteil am Aufbau der Struktur des Knochens (2). Wie bereits erwähnt differenzieren sich Osteoblasten aus MSCs. Der Prozess, der die Differenzierung der MSCs einleitet, wird Osteoinduktion genannt (14). Verschiedene Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) spielen dabei eine wichtige Rolle. Diese sind als organische Bestandteile im Knochengewebe

enthalten. Die BMPs sind induktiv wirksam und sind in der Lage die Neubildung von Knochengewebe einzuleiten (15). Der zweite Zelltyp sind die Osteoklasten, die den Gegenspieler der Osteoblasten darstellen. Sie entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) und entspringen damit einer anderen Zelllinie als die Osteoblasten (16). Die Remodellierung der Knochenmatrix ist abhängig von einem koordinierten Ablauf von Knochenaufbau und -abbau. Die Gesamtknochenmasse wird durch die Balance der Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten bestimmt. Nachdem Osteoklasten durch Abbauprozesse Knochensubstanz resorbiert haben, setzen sie und auch Makrophagen Wachstumsfaktoren frei die zur Gruppierung von Osteoblasten führt. Die Osteoblasten setzen sich in die Resorptionshöhlen, die sogenannten Howship-Lakunen und füllen sie mit Osteoid, eine weiche Grundsubstanz des späteren Knochens (3). Sie sind die einzigen Zellen im menschlichen Körper die in der Lage sind, neue Knochenmatrix zu generieren (17). Die Osteoblasten werden mit der Zeit von Knochengewebe umbaut und differenzieren sich zu Osteozyten und verbleiben in der Knochenmatrix (Abb. 2). Unter physiologischen Bedingungen dauert die Remodellierung und damit die Erneuerung der Knochenmasse 2-8 Monate, in der die meiste Zeit für den Aufbau von neuem Knochengewebe benötigt wird (3).

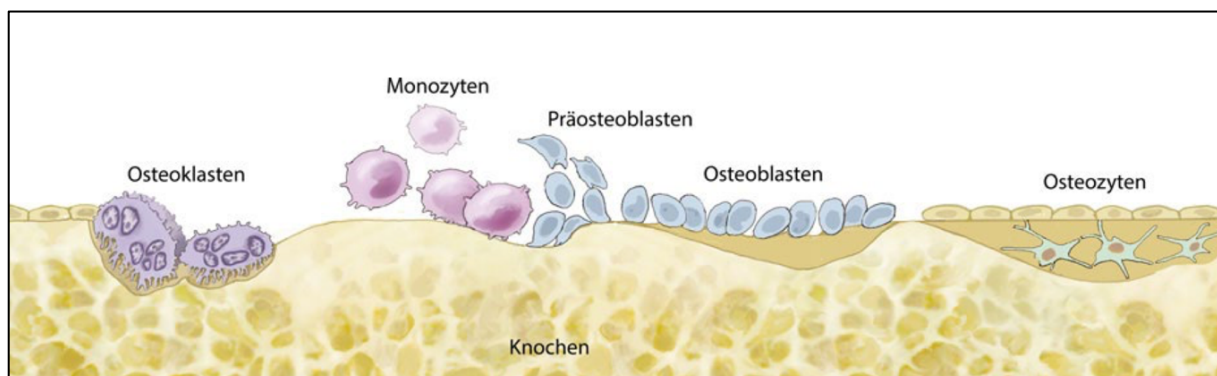


Abbildung 2: Schema der Remodellierung des Knochengewebes (Quelle: (3))

Die zentrale Rolle der Osteoblasten bei der Knochenneubildung und Frakturheilung ist für die Forschung von großem Interesse. Die Funktionen, die die Osteoblasten ausführen, werden u.a. durch spezifische Gene reguliert:

Das Osteopontin (OPN) ist ein Glykoprotein und Bestandteil der Knochenmatrix. Es wird unter anderem von Osteoblasten gebildet und ist am Aufbau der Knochenmatrix beteiligt (18). Es kontrolliert die Mineralisierung des Knochens und ist verantwortlich für die Bindung osteogener Zellen mit der Knochenmatrix (19). Das „Runx-related transcription factor 2“-Protein (RUNX2) induziert die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu unreifen Osteoblasten. Außerdem ist es an der Bildung von unreifer Knochenmatrix beteiligt. Gleichzeitig hemmt es in späteren Phasen der Entwicklung die Reifung der Osteoblasten und auch der Knochenmatrix, weshalb die Konzentration des Proteins mit zunehmender Reifung abnimmt

(20). Das „secreted protein acidic and rich in cysteine“ (SPARC) oder auch Osteonectin genannte Protein lässt sich in vielen Geweben zu unterschiedlichen Zeitpunkten und Situationen im Körper nachweisen. Zum Beispiel wird unter Stressbedingungen wie Endotoxinstimulation oder bei der Wundheilung von einer erhöhten Synthese des SPARC-Proteins berichtet. Dazu zählt auch die Entwicklung und der Aufbau von Knochengewebe, bei der sich hohe Konzentrationen des Proteins nachweisen lassen (21).

2.1.4 Endothelzellen

Das Endothel kleidet, wie der Name suggeriert, das innere der Gefäßwände aus. Es ist die Barriere zwischen dem fließenden Blut und dem Gewebe (22). Das Endothel hat aber noch weitaus mehr Funktionen zu erfüllen. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Durchblutung und des Blutdrucks, es dient dem Stoff- und Flüssigkeitsaustausch mit dem Gewebe und ist maßgeblich an der Hämostase und Koagulation, Inflammationsreaktion und Gefäßneubildung beteiligt (23). Unter normalen Bedingungen produziert und sezerniert das gesunde, unverletzte Endothel vasoaktive Substanzen. Diese dienen der Regulierung der Entzündungsreaktion und der Gerinnung (24). Bei inflammatorischen Prozessen in Geweben ist es erforderlich, dass Leukozyten aus dem Blutkreislauf austreten und in das entzündete Gewebe einwandern (Diapedese). Dieser Prozess setzt eine Kommunikation zwischen Endothelzellen und Leukozyten voraus. Die Endothelzellen in entzündetem Gewebe präsentieren auf ihrer Oberfläche Proteine, die von den Leukozyten erkannt werden und dadurch die Diapedese einleiten (25). Die vasodilatatorische Funktion des Endothels, die mechanisch und pharmakologisch ausgelöst werden kann, ist ein wichtiger Aspekt im klinischen Alltag. Einer der wichtigsten Vasodilatoren ist das Stickstoffmonoxid (NO)(22). Es wirkt dem sympathisch-adrenergen System, das vasokonstriktorisch wirkt, entgegen. Außerdem wird die basale Freisetzung von NO durch verschiedene Vorkommnisse erhöht, um einen normalen Tonus zu erhalten. Dazu gehört z.B. die Wandschubspannung durch den Blutstrom und die pulsatorische Dehnung der Gefäßwand durch den Herzschlag (26). Im gesunden, ununterbrochenen Endothel sorgt die Ausschüttung von NO und Prostaglandin I₂ (PGI₂) durch die Endothelzellen dafür, dass die Thrombozyten nicht aktiviert werden (24). Dadurch wird eine spontane Gerinnung, die gegebenenfalls lebensbedrohlich sein kann, verhindert. Kommt es allerdings zu einer Schädigung der Gefäßwand und zum Kontakt der Thrombozyten mit subendothelialen Zellen oder EZM werden sie aktiviert. Es kommt zur Adhäsion der Thrombozyten, um Gefäßdefekte zu verschließen. Außerdem wird der von-Willebrand-Faktor (vWF), Adenosindiphosphat und -triphosphat aus den Endothelzellen freigesetzt, was zusätzlich zur Thrombozytenaggregation führt (26).

Die Angiogenese bezeichnet die Ausbildung neuer Gefäße aus bereits bestehenden Gefäßstrukturen. Der Begriff der Vaskulogenese hingegen beschreibt die Neuausbildung von

Gefäßen aus mesodermalen Stammzellen, wie sie in der embryonalen Entwicklung stattfindet (27). Die Ausschüttung von NO und vaskulärem endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) durch die Endothelzellen beeinflusst maßgeblich die Angiogenese (28). Die Vasodilatation und die erhöhte Gefäßpermeabilität sorgen für eine Auswanderung von Proteinen ins umliegende Gewebe (Extravasion) (29). Es kommt zur Sezernierung von Plasminogenaktivatoren und Matrixmetalloproteasen durch die Endothelzellen. Die Zell-Zellkontakte der Endothelzellen gehen verloren und es kommt durch die VEGFs zur Migration und Proliferation der Zellen. Somit können bestehende Gefäße fusionieren und ein neues Lumen bilden. Anschließend kommt es zur Remodellierung der neuen Kapillaren indem z.B. der Lumendurchmesser und die Gefäßwanddicke umgebaut werden (22, 29-32). Ein wichtiger Faktor für die Knochenheilung ist die adäquate Blutversorgung der Zellen, denn ohne die Nähe zu Gefäßen, fehlt ihnen Sauerstoff und Nährstoffe. Die Folge ist die Inaktivität oder Nekrose der Zellen, was dazu führt, dass der Heilungsprozess erschwert wird und länger andauert. Es wird davon ausgegangen, dass bei einer Distanz von 200 µm zum Gefäßsystem keine ausreichende Versorgung der Zellen mehr stattfindet (2). Bei herkömmlichen Implantaten kann es dadurch die Adhäsion der Zellen auf dem Material erschweren.

Das Einbringen von Material in den menschlichen Körper kann eine Hürde für das Wachstum der Zellen sein. Das Aufbringen von Osteosyntheseplatten auf den Knochen kann durch den Druck des Materials die oberflächliche Vaskularisierung negativ beeinflussen (Abb. 3). Es wird berichtet, dass die unterbrochene Blutzufuhr das Risiko einer Refraktur in der ersten Zeit nach einer Operation erhöhen kann (33). Je größer eine Fraktur ist, desto größer muss auch das Implantatmaterial sein. Daraus resultiert, dass die Bereiche der gestörten Vaskularisierung größer werden und die Heilung dort zusätzlich erschwert wird, auch wenn das primäre Ziel der Stabilisierung erreicht werden konnte. Die bisher genannten Funktionen der Endothelzellen werden u.a. durch die spezifischen Gene der Zellen reguliert:

Das Glykoprotein „Cluster-of-Differentiation 31“ (CD31; PECAM-1) wird u.a. in Endothelzellen gebildet. Es spielt eine wichtige Rolle in der Angiogenese und der endothelialen Zellmigration (34). Der von-Willebrand-Faktor (vWF) ist ein Protein, das vor allem bei der Blutgerinnung eine Rolle spielt. Bei Endothelzellverletzungen wird unter anderem der vWF ausgeschüttet und vermittelt so die Adhäsion an Thrombozyten und die damit verbundene primäre Hämostase (35, 36). Ein anderes Gen das spezifisch für die Endothelzellen ist, ist der Kinase-insert-Domain-Receptor (KDR). Dieses Protein ist auch als VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor 2) bekannt. Diese Rezeptoren werden hauptsächlich auf der Gefäßendotheloberfläche exprimiert und regulieren die Angiogenese und Vaskulogenese (37).

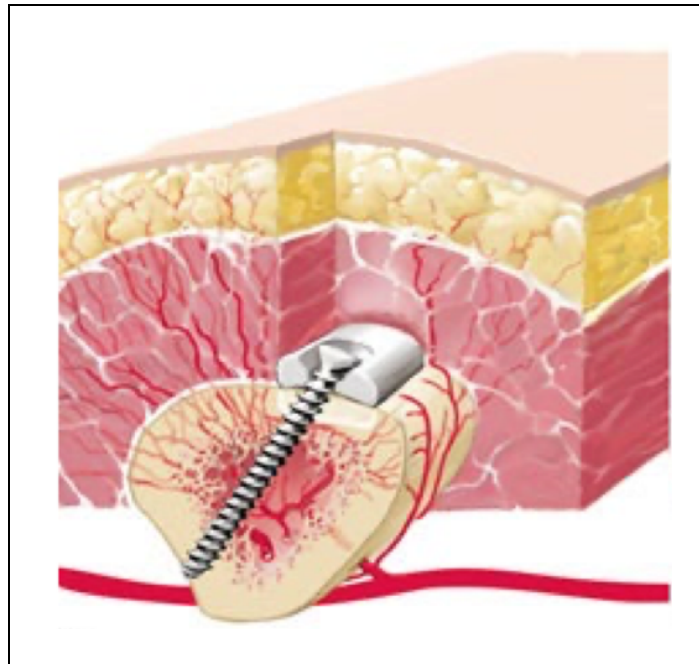


Abbildung 3: Vaskularisierung bei der Osteosynthese (Quelle: (3))

2.1.5 Therapeutische Verfahren

Die therapeutischen Optionen richten sich einerseits nach der Lokalisation der Fraktur, aber auch nach dem Schweregrad. Es können Fixateur externe, Totalendoprothesen, Platten, Drähte, Nägel oder Kombinationen aus diesen Materialien zur Therapie eingesetzt werden (7). Wenn die Wahl der Therapie z.B. auf eine Plattenosteosynthese hinausläuft, wird die Fraktur nach operativer Präparation und Reposition mittels einer Platte und Schrauben fixiert. Das Material, das in den Patienten eingebracht wird, besteht in der Regel aus Metall. Dazu gehören am häufigsten rostfreier Stahl, Kobalt-Chrom-Legierungen und Titan (38). Falls in sehr seltenen Fällen eine unbekannte Allergie gegen z.B. Chrom, Kobalt oder Nickel besteht, kann es auch zu Unverträglichkeiten kommen. Ist das vorher bekannt, wird die Verwendung von Osteosynthesematerial aus Titan und bei Totalendoprothesen aus einer Keramik-Polyethylen Kombination empfohlen (39). Als Implantatmaterial eignet sich das Titan von allen Metallen am besten. Grund dafür sind die mechanischen Eigenschaften, die gute Biokompatibilität und die chemische Stabilität des Materials (38). Auch die Idee von Materialbeschichtungen wurde in der Vergangenheit in Studien untersucht. Es gab bei Hüftendoprothesen bereits Beschichtungen des Femurschaftes mit Hydroxyapatit, welche in der Studie auch gute Ergebnisse erzielt haben (40). Auch wenn es in den letzten Jahren diverse Fortschritte und Weiterentwicklungen in diesem Bereich gab, hat sich bisher kein alternatives Material gefunden, um komplett auf die Metalle verzichten zu können. Bei metallischen Implantaten, ob Prothesen oder Osteosynthesematerial, kann es u.a. zu Infektionen kommen, die entweder intraoperativ oder durch hämatogene Streuung zu Stande kommen. Durch die Bildung eines Biofilms durch Bakterien auf der Implantatoberfläche kann dieser Infekt zu schwerwiegenden

Komplikationen führen, was meistens zu einer erneuten OP führt und sogar den Ausbau des Implantatmaterials zur Folge haben kann (41, 42). Außerdem ist beschrieben, dass es z.B. bei verzögerter Frakturheilung zu Platten- und Schraubenbrüchen des Osteosynthesematerials kommen kann (43).

Im Jahr 2020 wurden in Deutschland insgesamt 121.635 Patienten mittels Osteosyntheseverfahren operativ versorgt (44). Das bringt für einen langen Zeitraum die nötige Stabilität, um eine bestmögliche Knochenheilung zu gewährleisten. Oftmals ist es aber nach Monaten oder Jahren wieder nötig, die Platte zu entfernen. Gründe dafür können Schmerzen, Irritationen oder auch Bewegungseinschränkungen sein. In den Niederlanden z.B., sind Infektionen und Schmerzen bei den Patienten mit über 90% der Grund für die Entfernung des Materials (45). In der Pädiatrie ist es grundsätzlich so, dass Implantate nach Frakturen wieder entfernt werden. Da sich die Patienten noch im Wachstum befinden, ist die Sorge um einen kompletten Überbau eines Implantates groß, sodass eine spätere Entfernung zu Schwierigkeiten führen könnte (46). Zur Entfernung ist dann eine zweite Operation nötig. Das bedeutet allerdings auch wieder ein erneutes Risiko für den Patienten. In Deutschland waren im Jahr 2020 153.678 Patienten von einer Metallentfernung betroffen (44). Eine Materialentfernung ist ein Routineeingriff, bei dem beim Großteil der Patienten keine Komplikationen oder negativen Folgen auftreten. Allerdings birgt eine Operation immer Risiken, die einkalkuliert werden müssen. Es kann zu Wundinfektionen und Nervenschädigungen bis hin zu Brüchen des Implantatmaterials kommen. Dadurch verlängert sich die Operationszeit, da die Entfernung des Materials aufwendiger ist und spezielle Instrumente benötigt werden. Aus der verlängerten Operationszeit resultiert auch ein erhöhtes Infektions- und Komplikationsrisiko. Williams, B. R., et al. beschreiben für die genannten Komplikationen ein Risiko von 10,1% (47). Es muss auch bedacht werden, dass es auf anästhesiologischer Seite ebenso zu Komplikationen kommen kann. Eine gute operative Vorbereitung, konsequente Überwachung und erfahrene anästhesiologische Fachkräfte reduzieren zwar das Risiko erheblich, aber ein Restrisiko bleibt dennoch bestehen (48, 49). Außerdem herrscht nach Entfernung des Materials eine gewisse Zeit lang ein erhöhtes Refraktur Risiko, da die Stabilität des Knochens im Vergleich zur gesunden Seite zunächst vermindert ist. So wurde beschrieben, dass bei Plattenentfernungen am Unterarm, erst nach 6 Monaten 97% der Stabilität des Knochens wiederhergestellt ist (50). Eine zweite Operation zu vermeiden, kann auch von wirtschaftlichem Interesse sein. Im Schnitt sind Patienten nach einer Materialentfernung orthopädischer Implantate für 16,3 ($\pm 1,96$) Tage arbeitsunfähig (51). Dieser personelle Ausfall kann für Arbeitgeber und Betrieb wirtschaftliche und finanzielle Folgen haben.

2.2 Tissue Engineering

2.2.1 Definition

Das Tissue Engineering bezeichnet einen Bereich der regenerativen Medizin, der sich mit der Herstellung von biokompatiblen und biologisch abbaubaren Materialien befasst. Es werden funktionelle Konstrukte hergestellt, die mit Zellen und bioaktiven Molekülen verknüpft werden können (52, 53). Dabei können Scaffolds (Gerüste) aus Polymeren hergestellt werden, die z.B. Knochen ersetzen oder stützen sollen, bis die selbstständige Heilung des Körpers abgeschlossen wurde. Es können aber auch zellbeladene Gerüste implantiert werden, um Gewebe und EZM zu ersetzen und eine Geweberegeneration zu beschleunigen (54). Das unterstützt den Körper bei der Heilung von Verletzungen oder Krankheiten. Die im menschlichen Körper vorliegende dreidimensionale Umgebung der Zellen im Verbund miteinander und mit der Extrazellulärmatrix, ist ein Ansatzpunkt des Tissue Engineering. In-vitro 3D-Modelle können eine realistische Nachbildung dieser Situation von Organen und Geweben darstellen (55). Wenn bereits zellbeladene Biomaterialien hergestellt werden, wird von Bioprinting gesprochen. Mit diesen Biomaterialien sollen zelluläre Interaktionen stimuliert, die Zellmotilität verbessert, und die Proliferation und Differenzierung angeregt werden (56). Durch die Einarbeitung von Zellen in ein Polymergerüst und anschließender Implantation des Materials könnten Patienten mit Ihren eigenen Zellen behandelt werden. Das Gerüst baut sich mit der Zeit ab, während die Zellen proliferieren und neues Gewebe bilden (57). Das Tissue Engineering bietet mit seinen Möglichkeiten eine Alternative zum herkömmlichen Material aus Metall und ist ein vielversprechender Ansatz für die Geweberemodellierung.

2.2.2 3D-Druck

Der 3D-Druck (Synonym „rapid prototyping“), ist eine Technik, mit der 3D-Modelle mit Hilfe von computergestütztem Design (CAD) hergestellt werden können (58). Der 3D-Druck wird bereits in vielen Bereichen der Medizin eingesetzt und ist im Fokus der Forschung. Mit einem Computer, der spezifischen Software und dem Drucker selbst, kann das Material in die gewünschte Form und Größe gedruckt werden. Mittels dieser Software können medizinische 2D-Bilder wie z.B. CT und MRT in 3D-Modelle Schicht für Schicht gedruckt werden, sodass am Ende eine dreidimensionale Struktur entsteht (59). Dabei hat es bereits Anwendung in der Zahnmedizin, Kieferchirurgie und Neurochirurgie gefunden. Es wurden bereits Kieferimplantate auf diese Weise hergestellt und Patienten implantiert (60, 61). In der Neurochirurgie wird es z.B. für die Kranioplastie verwendet, in der das 3D-gedruckte Kunststoffmaterial sogar teilweise bessere Ergebnisse erzielt als autologe Knochendeckel (62). Auch in der Orthopädie wird viel an der Verwendung von 3D-gedruckten Materialien geforscht. Es ist von Interesse für spezifisch angefertigte Implantate für Patienten, für die operative

Planung und die präzise Herstellung von z.B. Prothesen (58, 63). Als Material für diesen Druck kommen verschiedene Stoffe in Betracht. Es können natürliche Stoffe wie u.a. Kollagen oder Fibrin genutzt werden. Aber auch synthetische Stoffe wie Silikone, Metalle oder Polyamide finden Anwendung (64, 65). Polylactone wie Polylactid (PLA), Polyglycolsäure (PGA) und Polycaprolacton (PCL) zählen zu den am häufigsten verwendeten biologisch abbaubaren Polymeren im medizinischen Bereich (66).

2.2.3 Polylactid

In dieser Arbeit wird als Ausgangssubstanz das Polylactid verwendet. Polylactid ist ein Polyester und ihr Ursprung ist die Milchsäure. Es kann z.B. aus Zuckerrohr oder Mais hergestellt werden (57). In der Regel wird es in der Industrie in Form von Granulat genutzt, welches für den 3D-Druck zu einem PLA-Filament verarbeitet wird. Dieses kann dann beim 3D-Druck durch Erhitzen wieder in eine formbare Masse gebracht werden sodass gewünschte Strukturen gedruckt werden können. Es stellt in vielen Bereichen der Forschung die Basis von 3D-gedruckten Konstrukten dar, da dieses Material hervorragend zu verarbeiten ist, hohe Biokompatibilität aufweist und biologisch abbaubar ist (67). Polylactide haben durch die langjährige Forschung mittlerweile auch klinische Anwendung gefunden. Es gab bereits Operationen von osteochondralen Defekten an der Patella und am oberen Sprunggelenk (OSG), bei denen Polylactid-Implantate verwendet wurden, um diese Defekte zu fixieren. Dabei wurden auch die Langzeitfolgen der Therapie untersucht und festgestellt, dass Polylactide durchaus gute Ergebnisse in der Biokompatibilität mit dem menschlichen Organismus zeigen (68). Auch an dislozierten Radiusfrakturen konnten bereits Poly-L/DL-Lactid-Stifte erfolgreich verwendet werden (69). Je nach Forschungsgebiet kann das PLA dann mit verschiedenen Stoffen kombiniert werden.

2.2.4 Bioglas

Das Bioglas ist ein Material, das dem Hydroxylapatit sehr ähnlich ist. Das Hydroxylapatit macht 99% der anorganischen Knochenmasse des menschlichen Körpers aus und ist außerdem Bestandteil der Zähne und des Zahnschmelzes (3). Deshalb wurde das Bioglas bereits häufig zur Reparatur von Knochen- und Zahndefekten in der Zahnheilkunde implantiert. Es konnten osteoinduktive Eigenschaften belegt werden und das Bioglas findet seit Jahren Anwendung für diese Problematiken (70). Das in dieser Arbeit verwendete Bioglas vom Typ S53P4 besteht zu 53% aus Siliziumdioxid (SiO_2). Ergänzt wird das durch 23% Natriumoxid (Na_2O), 20% Calciumoxid (CaO) und 4% Phosphorpentoxid (P_2O_5) (71). Es ist bereits bekannt, dass Bioglas Eigenschaften aufweist, die sich positiv auf die Knochenheilung auswirken können. So werden dem Bioglas antibakterielle, osteoinduktive und angiogene Eigenschaften zugeschrieben (72).

2.2.5 Chitosan

Das Chitosan ist die deacetylierte Form des Polysaccharids Chitin (73). Chitin kommt u.a. in Krebstieren und Insekten vor und ist ein wichtiger Bestandteil des Exoskeletts (74). In Lebensmitteln, Kosmetika, der biomedizinischen- und pharmazeutischen Branche findet das Chitosan bereits Anwendung (73). Die Eigenschaften des Chitosans sind vielfältig. Als Flockungsmittel für die Wasseraufbereitung, als Lipidbinder für Lebensmittel und die pflegenden Eigenschaften in der Kosmetik sind potentielle Anwendungsbereiche (73). Aber auch im medizinischen Bereich wird immer mehr am Chitosan geforscht. So wurde bereits ein Chitosan-Derivat als Trägermolekül in der Tumorthherapie genutzt und es zeigten sich vielversprechende Ergebnisse im Vergleich zum alleinigen Gebrauch des Zytostatikums (75). Eine weitere interessante Anwendung für ein kombinierten Stoff gab es bei parodontalen Defekten. Denn dort wurde ein Hydroxyapatit-Chitin-Chitosan-Komposit-Knochenfüllmaterial genutzt, das als selbsthärtende Paste, die Behandlung für die Geweberegeneration bei diesen Defekten beeinflussen soll (73). Es wurde auch berichtet, dass ein Chitosan-Alginat-Gerüst gute Adhäsionseigenschaften für Osteoblasten darstellen soll. Außerdem wird von einer guten Vaskularisierung und Kalzifizierung in diesem Gerüst gesprochen, was für eine potentielle Anwendung im Bereich des Tissue Engineering spricht (76). Auch die Wundheilungseigenschaften sollen hervorragend sein, was Einfluss auf die Möglichkeiten in der Wundbehandlung haben könnte (77). Vorallem in kombinierter Anwendung mit anderen Stoffen wird aktuell geforscht. Das Chitosan kann mit spezifischen Gruppen modifiziert werden, um bestimmte Funktionen auszuführen. Somit können Polymere für bestimmte Anwendungen entwickelt werden (73). Von großem Interesse sind auch die antibakteriellen Eigenschaften die das Chitosan mit sich bringt, da postoperative Infektionen immer ein Risikofaktor für das Einbringen von Fremdmaterial sind (78). Allerdings schränken die geringen mechanischen Eigenschaften des Chitosans die bisherige biomedizinische Anwendung ein (79).

3 Ziele

Ziel dieser Arbeit ist es, den Effekt von 3D-gedruckten Plättchen unterschiedlicher Zusammensetzung mit humanen Osteoblasten, Endothelzellen und Fibroblasten zu untersuchen. Die Materialien wurden in verschiedener Konzentration an Polylactid, Bioglas und Chitosan gedruckt und vorbereitet. Anschließend wurden die Zellen aufgebracht und die Proliferation, Genexpression und die zellspezifische Entwicklung in unterschiedlichen Assays untersucht und charakterisiert. Das Ziel war es, sowohl positive als auch negative Aspekte, die durch die Materialien entstanden sind, zu erkennen und einzuschätzen, ob das Material ein potenzieller Kandidat für den Knochenersatz sein könnte.

4 Material und Methoden

4.1 PLA-Bioglas

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erforscht, wie das Bioglas mit humanen Zellen interagiert. Bei den benutzten Verbundstoffen handelt es sich um reines PLA-Granulat (PLA-Filament Kristall Natur, 3dk.berlin, Berlin, Deutschland) mit einer Korngröße von 2-5 mm und Bioglas vom Typ S53P4. Die Mischung der verschiedenen Anteile erfolgt manuell, um Kompositionen mit 0%, 5%, 10% und 20% Bioglas-Anteil zu erhalten. In der Universität Darmstadt wurden diese Verbundfilamente hergestellt und in 3D gedruckt. In der Forschungsarbeit von Frau Eva Schätzlein aus der Forschungsgruppe Prof. Blaeser wird die Herstellung des Materials ausführlich beschrieben (71). In der Abbildung 4 A liegt das reine PLA vor, das als Kontrolle dient. In den Abbildungen 4 B-D sind die Modifikationen mit 5%, 10% und 20% Bioglas-Anteil dargestellt. Abzugrenzen vom reinen PLA sind sie makroskopisch u.a. durch die ungleichmäßigere Struktur und die vermehrte milchglasartige Verfärbung.

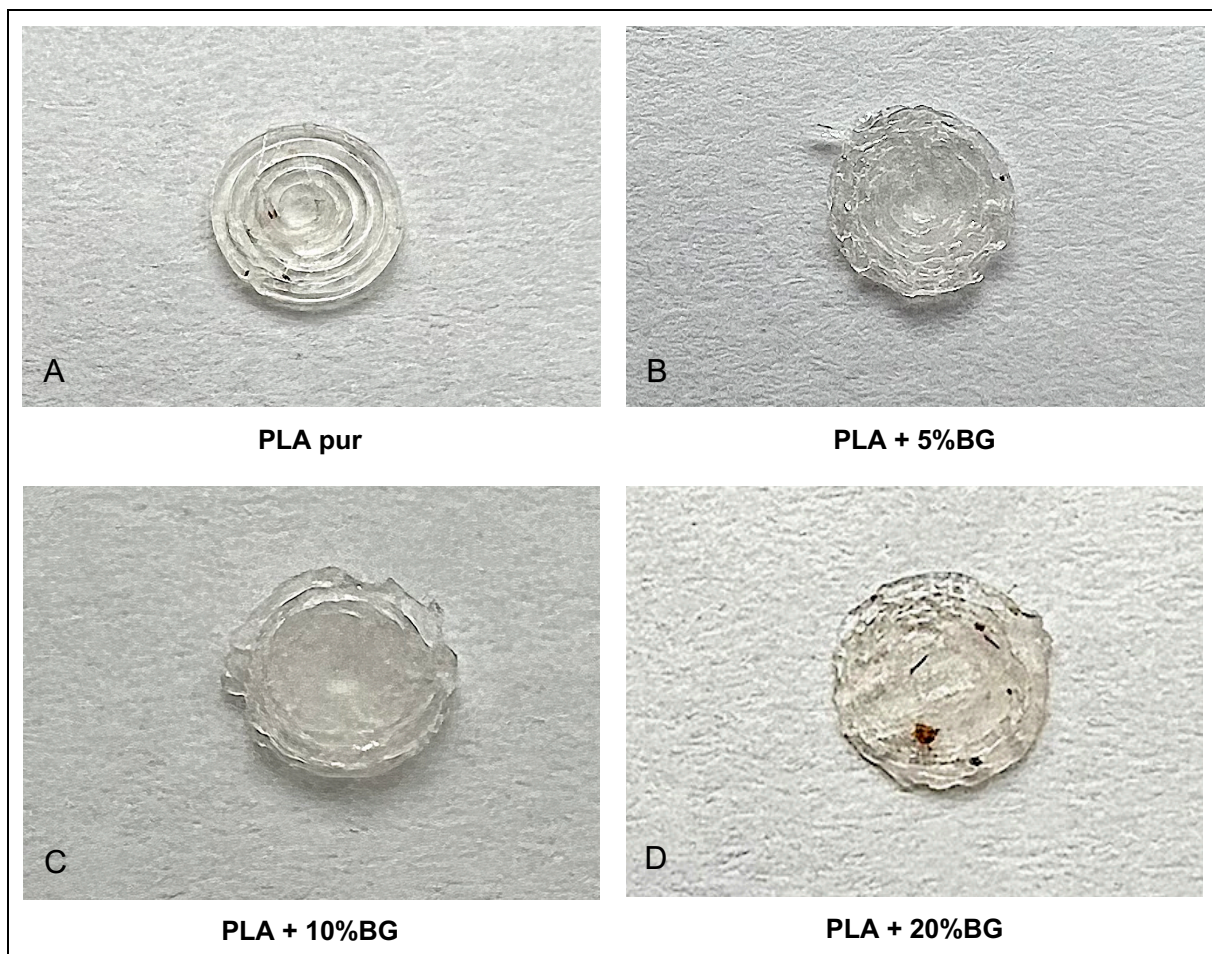


Abbildung 4: PLA-Plättchen mit unterschiedlichen Bioglas-Konzentrationen; Maße: \varnothing 0,5 cm

4.2 PLA-Chitosan

Als Grundsubstanz der 3D-gedruckten Plättchen verwendeten wir auch hier das Polylactid, das durch die Firma Biovox produziert und mit dem Chitosan kombiniert wurde. Das reine PLA, das in Abbildung 5 A dargestellt ist, diente als Vergleichskontrolle zu den Chitosan-Modifikationen mit 1% (Abb. 5 D) und 10% (Abb. 5 E) Chitosan. Außerdem lagen noch Chitosan-Derivate vor, dazu gehört das 1% Chitosan-Salicylat (CTS) in Abbildung 5 B, das 1% Chitosan-Acetat (CA) in Abbildung 5 C und ein Chitosan-Komplex (CTK), die alle ebenfalls untersucht und verglichen wurden.

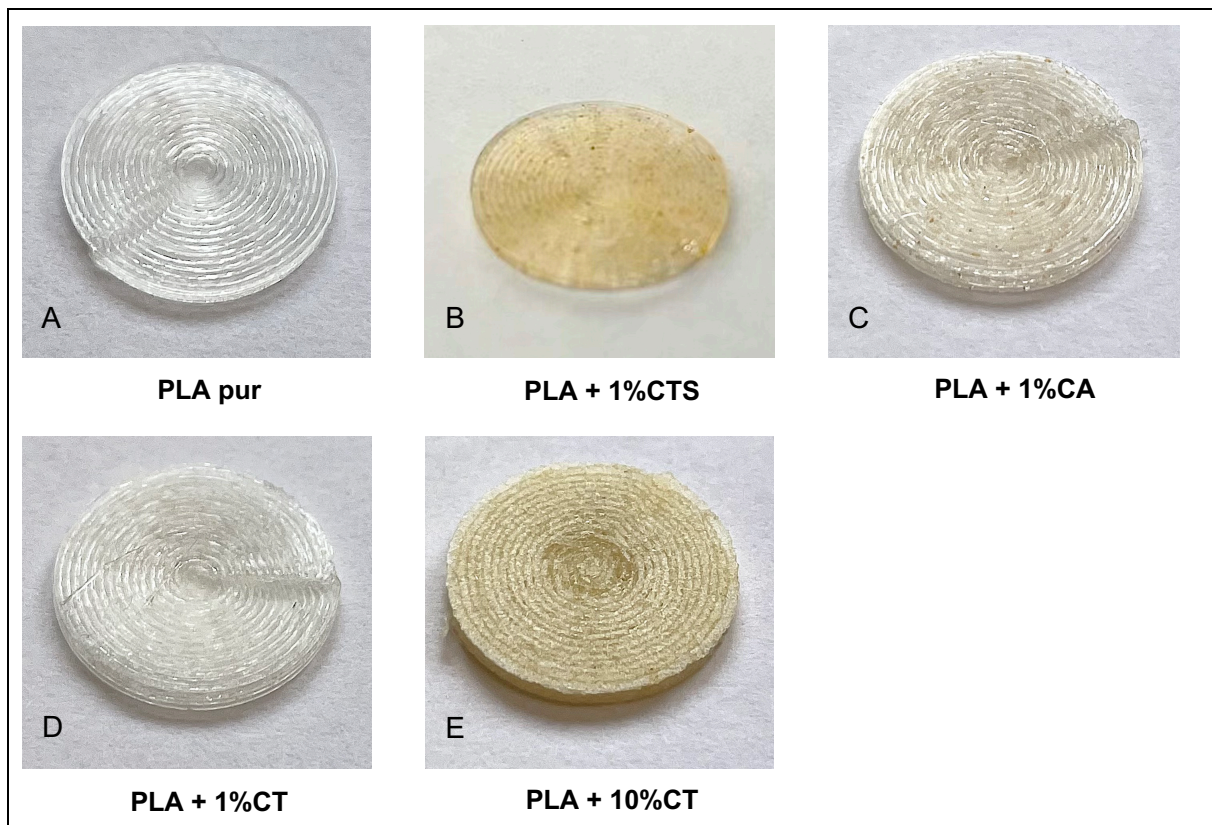


Abbildung 5: PLA-Plättchen mit unterschiedlichen Chitosan-Modifikationen; Maße: \varnothing 1,5 cm

4.3 Versuchsdurchführung

4.3.1 Zellkultur

Sämtliche Arbeiten wurden zum Ausschluss von Kontaminationen unter einer Sterilbank der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten erfolgte eine Flächen- und Hilfsmitteldesinfektion. Die Inkubation der Zellen fand in einem Inkubator (HERAcell 240, Heraeus) bei 37°C und 5% CO₂ statt.

4.3.1.1 Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)

Die HUVECs sind aus Patienten isolierte und anonymisierte Endothelzellen, die von PromoCell® bezogen wurden. Für die HUVECs wurde ein spezielles Medium genutzt, das mit verschiedenen Zusätzen versehen wurde und nachfolgend aufgeführt ist.

Endothelzellen (HUVEC): EBM-2® + EGM-2™ SingleQuots®
+ 10% FCS (Fetales Kälber Serum)
+ 1% PS (Penicillin+Streptomycin Solution)

4.3.1.2 Humane Osteoblasten (hOBs)

Die humanen Osteoblasten stammen aus Knochenfragmenten von Patienten, die sich einer orthopädischen oder unfallchirurgischen Operation unterzogen haben. Diese Fragmente wären andernfalls entsorgt worden und mit der Einverständniserklärung der Patienten konnten die hOBs aus diesen Fragmenten isoliert und anonymisiert werden. Die Isolierung der hOBs wurde in der Arbeit von Hofman et al. ausführlich beschrieben (80). Das genutzte Medium setzt sich aus den folgenden Zusätzen zusammen.

Osteoblasten (hOB): DMEM/F-12 (1:1) + GlutaMAX™
+ 10% FCS
+ 1% PS

4.3.1.3 Fibroblasten

Die murinen Fibroblasten wurden von ATCC® erworben und für einen Zytotoxizitätsassay genutzt. Das Medium für die Zellen bestand aus den folgenden Zusätzen.

Fibroblasten (L929): DMEM (1X)
+ 10% FCS

4.3.1.4 Virustransduktion

Die Virustransduktion wurde nach Sicherheitsstufe 2 (S2) durchgeführt. Mit diesem Prozess wurde ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) in die Endothelzellen oder Osteoblasten eingebracht. Dazu wurden die benötigten Zellen (25.000 Zellen/Well) 24 Stunden vor der Transduktion ausgesät. Für die Transduktion wurde ein Medium aus 5 ml zellspezifischem Medium und 5 µl Protaminsulfat angesetzt. Es wurden 500 µl dieser Lösung in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß (Eppendorf SE, Germany) pipettiert und anschließend das Virusmaterial hinzugefügt. Außerdem wurden 500 µl des Protaminsulfat-Mediums in jedes Well mit den angesetzten Zellen pipettiert. Aus dem Virusgefäß wurden dann 50 µl zu jedem Well dazugegeben. Nach 5 Stunden wurde das Medium entsorgt und frisches Medium mit 10% FCS hinzugefügt. Alle Materialien wurden entsprechend der S2-Leitlinie entsorgt. Am nächsten Tag wurde die Prozedur wiederholt und die Virustransduktion abgeschlossen.

4.3.1.5 Zellvorbereitung

Zur Vorbereitung wurde die benötigte Zellart, die bei -80°C im Stickstoff-Tank lagert, entnommen und kurz bei Zimmertemperatur angetaut. Parallel wurden 40 ml zellspezifisches Medium mit einer Pipette (accu-jet® pro, Brand GmbH; Costar® Stripette®, Corning®) in ein 50 ml Reagenzgefäß (Cellstar® Tubes) gegeben. Die Zellen wurden hinzugefügt und das Reagenzgefäß bei 1400 Umdrehungen pro Minute (rpm) für 5 Minuten (min) zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge). Anschließend wurde der Flüssigkeitsüberstand mit einer Pipette abgesaugt und im Virusabfall entsorgt. Die zentrifugierten Zellen wurden leicht aufgeschüttelt, um die verdichteten Zellen voneinander zu lösen. Es wurden 11-13 ml Medium hinzugegeben, mittels Pipette vermischt und die gesamte Menge in eine T-75 Zellkulturflasche (Greiner Bio-One Cellstar® Germany) überführt. Somit sind die Zellen für die Anzucht vorbereitet und können für verschiedene Experimente genutzt werden. Der identische Ablauf wurde für die Endothelzellen, die Osteoblasten und die Fibroblasten durchgeführt.

4.3.1.6 Austausch des Mediums

Es war ein regelmäßiger Austausch des Mediums nötig, um die Versorgung mit Nährstoffen zu gewährleisten, da die Zellen oft für 1-2 Wochen proliferieren mussten, bevor sie weiterverarbeitet werden konnten. Dazu wurde das Medium mit einer Pipette aus der Zellkulturflasche abgesaugt und im Virusabfall entsorgt. Anschließend wurde frisches Medium (11-13 ml) hinzugegeben und die Zellkulturflasche wieder im Inkubator gelagert.

4.3.1.7 Vorbereitung der 96-Well Platte mit den Bioglasplättchen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	●	●	●								
B												
C	●	●	●	●								
D												
E	●	●	●	●								
F												
G	●	●	●	●								
H												

Abbildung 6: Schematische Anordnung der Bioglas-Plättchen in 96-Well Platte

Zur Vorbereitung auf die Versuche wurde entweder eine 96-Well Platte mit oder ohne Ultra – Low Attachment Surface benutzt. Wenn Zellkontrollen ohne BG-Plättchen geplant waren, wo die Zellen am Boden der Wells adhären sollten, wurden 96-Well Microplatten (PS, F-Boden, Clear; GreinerB Bio-One) genutzt. Sollte hingegen z.B. RNA isoliert werden, wo die reinen PLA-Plättchen die Kontrollen darstellen, wurde eine 96-Well Platte mit Ultra - Low Attachment Surface (Costar®, Corning®) benutzt. Meist wurden 2-4 PLA-BG-Plättchen jeder Modifikation benötigt. Diese wurden wie z.B. in Abbildung 6 dargestellt in die Wells gegeben und beschriftet, sodass eine spätere Verwechslung ausgeschlossen ist. Die Plättchen wurden dann für 30 Minuten unter UV - Licht sterilisiert. Anschließend wurde das für die Zellen spezifische Medium für 30 min hinzugegeben, um die Plättchen auf den Versuch vorzubereiten. Es sorgt für die komplette Benetzung der Oberfläche mit Flüssigkeit, sodass die Wahrscheinlichkeit der Adhäsion durch die Zellen gesteigert werden konnte und das Medium auch in etwaige Poren dringen konnte, um die Versorgung der Zellen auch dort zu gewährleisten.

4.3.1.8 Vorbereitung der 24-Well Platte mit den Chitosan-Plättchen

Die Vorbereitung war identisch wie unter 4.3.1.7 beschrieben, nur das für die Chitosan-Plättchen eine andere Well-Platte verwendet wurde. Es wurde eine 24-Well Platte mit oder ohne Ultra - Low Attachment Surface (Corning®) benutzt, da die Plättchen die dreifache Größe im Vergleich zu denen mit Bioglas besitzen.

4.3.1.9 Ablösung und Weiterverarbeitung der Zellen

Das Medium wurde zunächst aus der T-75 Zellkulturflasche abgesaugt und im Virusabfall entsorgt. Es wurden 10 ml Phosphatpufferlösung (PBS) zu den Zellen gegeben, anschließend wieder abgesaugt und verworfen. Zur Ablösung der Zellen, wurden 2 ml Accutase® (SIGMA-ALDRICH) zu einer T-75 Flasche hinzugegeben und für 3-5 min auf die Heizplatte (MEDAX Nagel GmbH Kiel) gestellt. Durch leichtes seitliches Schütteln der T-75 lösten sich die Zellen vom Boden, was unter dem Lichtmikroskop (Wilovert 30 Labormikroskop) kontrolliert wurde. Anschließend wurden 12 ml des entsprechenden Mediums hinzugegeben und die gesamte Flüssigkeit wurde in ein 50 ml Reagenzgefäß überführt. Es folgte die Zentrifugation bei 1400 rpm für 5 Minuten. Der Flüssigkeitsüberstand wurde abgesaugt und im Virusabfall entsorgt. Die verdichteten Zellen konnten durch leichtes Schütteln gelöst werden und dann weiterverarbeitet werden.

4.3.1.10 Aussäen und Zählung der Zellen

Nach Ablösen und Zentrifugation der Zellen (siehe unter 4.3.1.9) wurden 2-4 ml Medium zu den Zellen gegeben und durch Pipettieren vermischt. Aus dem Gemisch wurden 20 µl mit einer Pipette (Eppendorf Research) entnommen, und in die Zählkammer (Luna™ Cell Counting

Slides) gegeben und im „automated cell counter“ (Luna™) gezählt. Die Zählung ergab dann die Menge an lebenden Zellen/ml. Mit der folgenden Rechnung wurde dann ermittelt, wieviel μl des Zellgemischs und wieviel μl oder ml Medium benötigt wurden um die benötigte Anzahl an Zellen/Well zu erreichen. In der Regel wurden beim Proliferationsassay sowohl bei Endothelzellen als auch bei den Osteoblasten 10.000 Zellen/Well benötigt. Für die Versuche zur RNA-Isolierung und anschließender qPCR wurden bei Endothelzellen 50.000 Zellen/Well und bei Osteoblasten 25.000 Zellen/Well benutzt.

$$\frac{\text{„Anzahl der benötigten Zellen“} \times 1000}{\text{„vorhandene Zellen“}} = x \mu\text{l}$$

x μl : Menge die aus dem Zellgemisch entnommen werden muss

Die mit der Formel errechnete Menge wurde dem Reagenz entnommen und mit der Menge Medium ergänzt, die insgesamt für alle Wells nötig war.

4.3.2 Proliferationsassay

Zunächst wurde die für alle Versuchstage benötigte Menge an alamarBlue™ (AIBI) Lösung angesetzt. Die Lösung besteht aus einem Teil Resazurin und 9 Teilen Medium. Je nach Verwendung von Osteoblasten oder Endothelzellen, wurde das entsprechende Medium genutzt (siehe unter 4.3.1.1/4.3.1.2). Nach dem Aussäen der Zellen auf jeweils 2-4 Plättchen jeder Modifikation, wurden sie für 24 Stunden inkubiert. Am Tag 1 wurde das Medium abgesaugt und im Virusabfall entsorgt. Daraufhin wurde die vorher angefertigte AIBI-Lösung in jedes Well pipettiert. Zusätzlich wurden auch 3 Kontroll-Wells mit der AIBI-Lösung angesetzt. In eine 96-Well Platte kamen 310 μl der AIBI-Lösung und in eine 24-Well Platte 500 μl der AIBI-Lösung. Für 4 Stunden wurden die Zellen in dieser Lösung inkubiert. Anschließend folgte das Pipettieren von 3x 100 μl /Well der AIBI-Lösung in eine neue 96 Well Platte (Greiner Bio-One Microplate, 96-Well). Die neue 96-Well Platte wurde im Glomax® Photometer (Promega) platziert und die Fluoreszenzmessung durchgeführt (Exzitation/Emission: 560nm/600nm). Die restliche AIBI-Lösung wurde aus den Wells mit den Plättchen und Zellen abgesaugt und im Virusabfall entsorgt. Es wurde bis zur nächsten Messung frisches Medium hinzugefügt. Unter dem EVOS® Fluoreszenzmikroskop konnten mit dem GFP-Filter Bilder von den grün fluoreszierenden Zellen angefertigt und abgespeichert werden. Unter Umständen war es nötig die Plättchen vorsichtig mittels einer sterilen anatomischen Pinzette zu wenden, um die Zellen auf beiden Seiten detektieren zu können. Anschließend kamen die Zellen wieder in den Inkubator bis zur nächsten Fluoreszenzmessung, die an den Tagen 4 und 7 erneut durchgeführt wurde.

4.3.3 Ribonukleinsäuren - Isolierung (RNA – Isolierung)

Bei den HUVECs wurden 50.000 Zellen/Well und bei den Osteoblasten 25.000 Zellen/Well benötigt, um eine ausreichende Menge an RNA isolieren zu können. Von jeder Modifikation wurden 8-10 Plättchen genutzt, von denen die Zellen für die RNA-Isolierung an Tag 1 (4-5 Plättchen) und Tag 4 (4-5 Plättchen) abgelöst wurden. Nach der Ablösung und Zentrifugation wurden die Zellpellets bei -80°C gelagert. Die RNA-Isolierung aus den gewonnenen Zellen erfolgte dann mit einem RNA – Kit (peqlab – VWR Life Science). Die ersten Schritte waren die Homogenisierung und die Lyse mittels eines RNA-Lyse Puffers. Im 2. Schritt wurde die DNA des Lysats durch Zentrifugation entfernt und das Filtrat weiterverwendet. Die RNA des Filtrats wurde zunächst gebunden und mit unterschiedlichen Puffern mehrmals gewaschen. Im letzten Schritt folgte die Elution. Das bedeutet die RNA wurde aus dem Gefäß mittels Zentrifugation in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß freigesetzt. Anschließend konnte die RNA direkt verarbeitet oder bei -80°C eingefroren werden.

4.3.4 Spektralphotometrische Messung

Mit dem NanoDrop One Photometer (Thermo Scientific) wurde die in der Isolierung gewonnene RNA quantitativ in µg/µl gemessen. Für die automatische Messung wurde 1 µl RNA auf den Sensor des Geräts pipettiert. Die RNA-Menge und auch die Ratio 260/280 wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und sorgfältig notiert. Die Ratio 260/280 ist ein Maß zur Einschätzung der Kontamination der Probe und damit die Reinheit der gemessenen RNA, was u.a. die Qualität der Probe und die bisherige labortechnische Arbeit widerspiegelt, wohingegen die RNA-Menge für den Ansatz in der qPCR relevant ist.

4.3.5 Reverse Transkription

Die reverse Transkription erfolgte mit dem cDNA-Kit von New England Biolabs Inc. Für die Herstellung der cDNA mittels reverser Transkription wurden 2 verschiedene Ansätze mit unterschiedlichen Zusätzen benötigt.

Ansatz 1	Ansatz 2
11 µl RNA (ggf. mit RNA-freiem Wasser ergänzen)	2 µl 10x MuLV Reverse Transkriptase – Puffer (New England Biolabs Inc.)
2 µl Random Primer (Promega)	2 µl RNA-freies Wasser
2 µl dNTP (Thermo Scientific)	1 µl M-MuLV Reverse Transkriptase New England Biolabs Inc.)
= 15 µl	= 5 µl

Tabelle 1: Ansätze für die Reverse Transkription

Die in Tabelle 1 dargestellten Ansätze beziehen sich auf eine Probe und wurden mit der Gesamtmenge der vorhandenen Proben multipliziert und angesetzt. Die 15 µl aus Ansatz 1 wurden in beschriftete Tube Strips (peqlab) pipettiert und in den Thermocycler PeqStar 2X (peqlab) zur Transkription gegeben. Ansatz 2 wurde, wie in Tabelle 1 dargestellt, vorbereitet und in Schritt 3 des Programms (Tabelle 2) zu den Proben hinzugegeben. Die anschließende Lagerung der cDNA erfolgt bei -20°C.

Programm für Reverse Transkription mit *Thermocycler PeqStar 2X (peqlab)*:

1. Heat Lid to 110°
2. 5 min 65°
3. 6 min 25° (in diesem Schritt wird Ansatz 2 hinzugegeben)
4. 1 Std. 42° (Replikation)
5. 20 min 65° (Inaktivierung Rev.Tra)
6. Store forever 4°

Tabelle 2: Programm für die reverse Transkription

4.3.6 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

In dieser Arbeit wurden verschiedene Gene für die qPCR genutzt. Die spezifischen Gene für die Osteoblasten und Endothelzellen sind unter Punkt 2.1.3 und 2.1.4 beschrieben. Außerdem wurde zusätzlich auch ein sogenanntes Housekeeping-Gen benutzt, welches als interner Kontrollwert dient. Ein Housekeeping-Gen, oder auch Kontroll-Gen genannt, wird in verschiedenen Gewebetypen des Menschen exprimiert. Das Besondere dabei ist, dass die Expression dieser Gene in den Zellen konstant bleibt. Somit wird eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Proben ermöglicht. In dieser Arbeit wurde das Gen für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet, welches eines der am häufigsten genutzten Housekeeping-Gene für den Vergleich von Genexpressionsdaten ist (81). Der Ansatz für die qPCR wurde als Triplikat angefertigt. Die 20 µl cDNA aus der reversen Transkription wurden 1:5 mit RNA-freiem Wasser verdünnt um ausreichend Material für alle benötigten Primer zur Verfügung zu haben. Es wurde ein Primer-Mix benötigt, der aus den folgenden Zusätzen besteht:

Primer-Mix:

- 4,8 µl RNase free H₂O (QIAGON)
- 0,1 µl Forward Primer (Eurofins Genomics)
- 0,1 µl Reverse Primer (Eurofins Genomics)
- 10 µl Blue SyBr Green Mix (Biozym)

Tabelle 3: Primer Mix

Die in Tabelle 3 genannten Angaben gelten für 1 Well. Die Anzahl der Proben wurden als Triplikat angesetzt und deshalb mit Faktor 3 multipliziert und es wurden zusätzlich noch 3 Wells zur Kontrolle ohne RNA (NTC=No Template Control) benötigt. Damit wurde die für den Primer-Mix benötigte Menge an Wells errechnet.

Diese 15 µl des Primer-Mix wurden mit der ErgoOne® Single-Channel Pipette (Starlab) in die errechnete Menge Wells der 96-Well Platte (Biozym Scientific GmbH) pipettiert. Anschließend wurden 5 µl der cDNA als Triplikat in die Wells pipettiert. Die Platte wurde mit Klebefolie (MicroAmp™ Optical Adhesive Film) verschlossen und in den Thermocycler für die qPCR (qTower³ G) gegeben.

Die Software, die für die qPCR benutzt wurde, war die qPCRsoft (Analytik Jena AG). Die Einstellungen für die qPCR in diesem Softwareprogramm sind in Tabelle 4 aufgeführt.

3 Steps	°C	m:s	Go to	loops	ΔT(°C)	ΔT(s)	°C/s
1	95	02:00	-	-	-	-	8
2	95	00:05	-	-	-	-	6
3	60	00:25	2	39	-	-	6

Kanal	Anregung	Detektion	Farbstoff	Gain
Blue	470nm	520nm	SybrGreen	5

Tabelle 4: Softwareeinstellungen qPCR

Die Proben wurden im Programm mit den entsprechenden RNA-Nummern, den jeweiligen Primern und der „No Template Control“ (NTC) beschriftet und anschließend wurde die Messung gestartet.

4.3.7 Matrigel®

Das Matrigel® ist eine Substanz, die der extrazellulären Matrix der Basalmembran ähnelt und die Zelldifferenzierung fördert (82). Sie enthält verschiedene Stoffe wie z.B. Laminin und Kollagen (83). Das spezielle am Matrigel® ist, dass es bei niedrigen Temperaturen flüssig ist und sich bei 37°C in eine gelartige Substanz verfestigt. Dadurch wird ein 3D-Konstrukt geschaffen, indem die Zellen adhären können, um zu wachsen und sich netzartig zu verflechten. In diesem Versuch wurde untersucht, ob das Bioglas einen Einfluss auf die Angiogenese der Endothelzellen hat. Dazu wurde ein „additives Medium“ hergestellt, in dem das reine PLA und die verschiedenen Bioglas-Modifikationen für 48 Stunden inkubierten, sodass das Medium die gelösten Stoffe aufnimmt (Abb. 7).

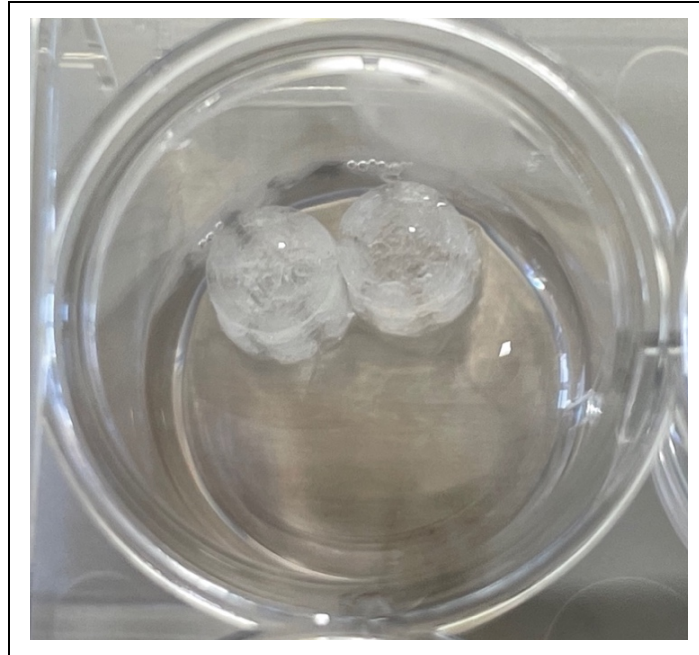


Abbildung 7: „additives Medium“ - PLA + 0% Bioglas - Cages in Medium für 48 Stunden

Oft werden Stammzellen für die Versuche mit dem Matrigel® verwendet, in dieser Arbeit wurden allerdings HUVECs genutzt. Die Zellen wurden, wie unter Punkt 4.3.1.9 beschrieben, abgelöst, zentrifugiert und anschließend ausgezählt. Dazu wurden 10 µl der Zellen mit 10 µl Trypan Blau (gibco) gemischt, in eine Zählkammer gegeben und mit dem automated cell counter (Luna™) ausgezählt. Für diesen Versuch wurden 50.000 Zellen/Well benötigt. Nach der Zählung wurde die nötige Menge an Zellen mit Medium verdünnt und mit gleichen Anteilen an Matrigel® gemischt. Im nächsten Schritt mussten zügig 50 µl dieser Mischung (25 µl Zellen/25 µl Matrigel®) in die benötigte Menge Wells einer 96-Well Platte pipettiert werden. Es waren in der Regel 2 Wells für jede Modifikation vorgesehen. Anschließend wurden die Proben 30 Minuten inkubiert, damit das Matrigel® seine feste Form annehmen konnte. Danach wurden 200 µl des „additiven Mediums“ in jeweils 2 Wells pipettiert und für 24 Stunden inkubiert. Am folgenden Tag wurden Fotos unter dem Fluoreszenzmikroskop (EVOS®) angefertigt. Von jedem Well sind 4 Aufnahmen mit zufälliger Lokalisation in einer Vergrößerung von 400 µm erstellt worden. Durch die Wahl zufälliger Bereiche im Mikroskop, sollte eine mögliche Fehlerquelle, die durch das gezielte Auswählen von Bereichen entstehen könnte, vermieden werden. Diese Fotos wurden mit ImageJ® ausgewertet. Dazu wurde ein spezielles Programm zum Erkennen und Auswerten von Gefäßproliferationen benutzt. Der Angiogenese Analyzer. Die graphische Darstellung erfolgte mit Graphpad Prism 9.1.1 (GraphPad Software).

4.3.8 Chorioallantoic-Membran-Assay (CAM – Assay)

Dieser Versuch wurde durch die Zusammenarbeit mit der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

Die Chorio-Allantois-Membran (CAM) ist eine hochgradig vaskularisierte Membran befruchteter Hühnereier. Sie bietet durch die leichte Zugangsmöglichkeit ein gutes angiogenes Screening-Instrument (84). Die Durchführung dieses Assays wurde durch Wiesmann et al. 2021 ausführlich beschrieben und die Versuchsreihe nach dieser Methode durchgeführt (85). Die Schale der Eier wurde eine Woche nach Befruchtung zum Teil eröffnet und entfernt. Wie in Abbildung 8 dargestellt, wurde jeweils ein sterilisiertes Bioglasplättchen auf die CAM eines Eis platziert. An Tag 0, 3, 5 und 7 wurden Fotos der Plättchen mit dem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BXFM, OLYMPUS DEUTSCHLAND GmbH, Hamburg, Germany) angefertigt. Anschließend folgte die Auswertung mittels ImageJ® mit dem Angiogenese Analyzer.



Abbildung 8: Aufnahme eines Hühnereis mit Präparation der CAM und aufliegendem Bioglas-Plättchen

4.3.9 Zytotoxizitätsassay

Für diesen Versuch wurden murine Fibroblasten (L929) genutzt. Das Medium für diese Zellen ist das DMEM (gibco) + 10% FCS (Biochrom AG) + 1% PS (SIGMA-ALDRICH). Die Zellen wurden aus dem N2-Tank entnommen und wie unter Punkt 4.3.1.5 beschrieben vorbereitet. Es wurden 10.000 Zellen/Well benötigt und nach der Zählung in eine 96-Well Platte ausgesät.

Für 24 Stunden wurden 100 μ l Medium hinzugefügt, sodass die Zellen adhäreren konnten. Parallel wurde Medium aus dem reinen PLA-Plättchen und den verschiedenen Chitosan-Modifikationen hergestellt. Dafür wurde je ein Plättchen/Versuchsreihe in eine 24-Well Platte gegeben und für 30 min unter UV-Licht sterilisiert. Anschließend kam für 24 Stunden 1 ml Medium auf die Plättchen, um möglichst viele Stoffe aus den Materialien zu lösen (Abb. 9).



Abbildung 9: Inkubation PLA + Chitosan-Plättchen in 1 ml Medium

Außerdem wurde eine Lösung aus 1,5 ml Resazurin und 13,5 ml Medium hergestellt. Nach 24 Stunden wurde das Medium aus der 96-Well Platte abgesaugt. In jeweils 5 Wells wurden 100 μ l Medium des reinen Polylactids oder der Chitosan-Derivate pipettiert. Zusätzlich wurden zur Kontrolle 5 Wells mit klassischem Medium angesetzt. Erneut wurde nach 24 Stunden das Medium in der 96-Well Platte abgesaugt und verworfen. Für 4 Stunden wurden 310 μ l der Resazurin-Lösung in jedes Well pipettiert. Anschließend wurden aus jedem Well 3x 100 μ l in eine separate 96-Well Platte überführt und im Photometer eine Fluoreszenzmessung wie unter Punkt 4.3.2 durchgeführt.

4.4 Auswertung und Statistik

Die Auswertung der Versuche und Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft® Excel (Version 16.65) aus Microsoft Office 365 und Graphpad Prism 9.1.1 (GraphPad Software).

5 Ergebnisse

5.1 PLA-Bioglas

5.1.1 Proliferationsassay

Um zu untersuchen, wie sich die PLA-BG-Plättchen auf das Wachstum der HUVECs auswirken, wurden mehrere Proliferationsassays durchgeführt. Im Rahmen dieser Versuche, wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop Bilder der Endothelzellen angefertigt, um das Wachstum und die Eigenschaften der Zellen zusätzlich zu den Messungen beurteilen zu können. Um das zu ermöglichen, wurden virustransduzierte, grün fluoreszierende Endothelzellen benutzt. Die Abbildungen (10 A-D) zeigen die jeweiligen Plättchen, auf denen die adhärennten Zellen an Tag 4 des Assays dargestellt sind.

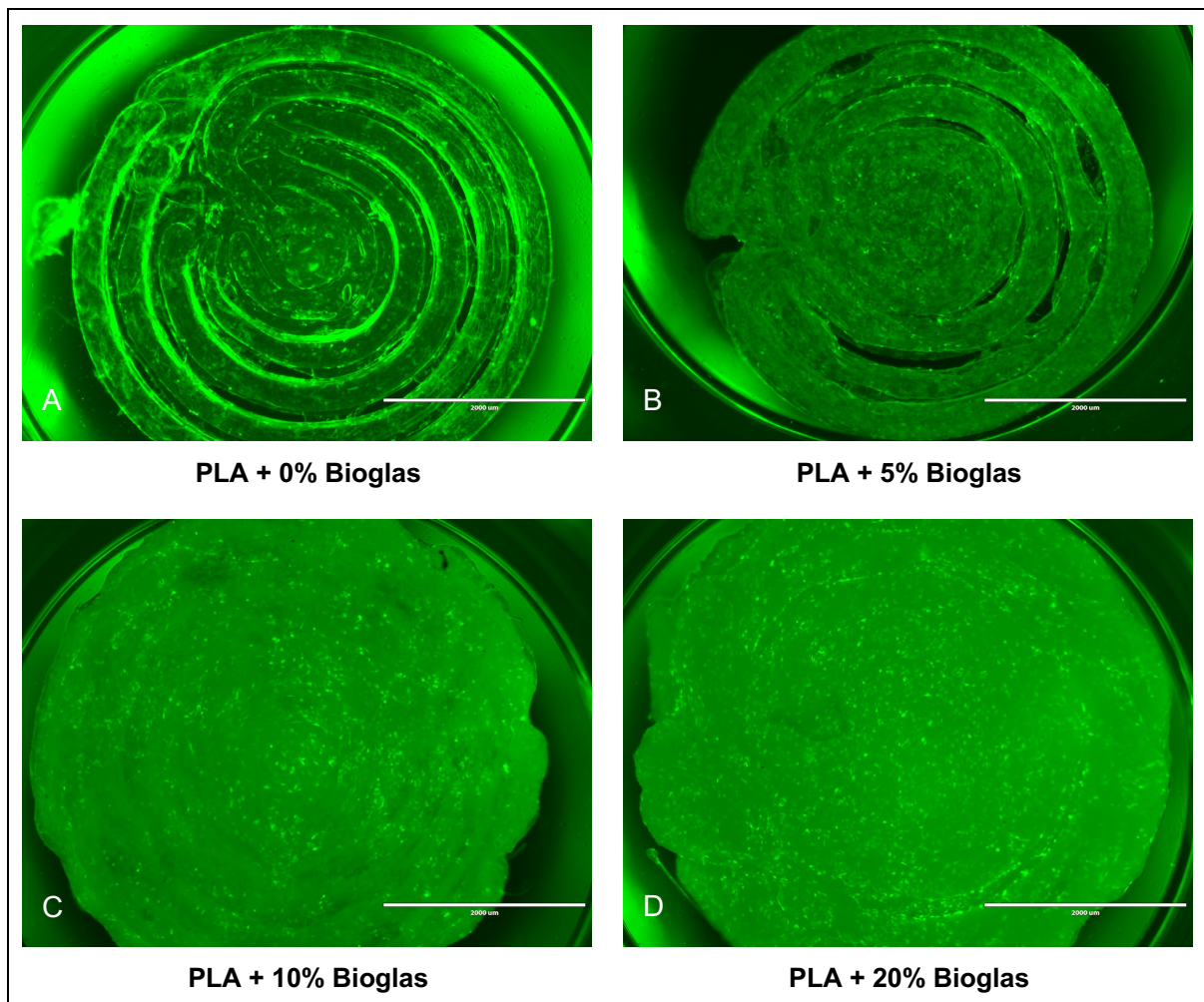


Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der HUVECs an Tag 4 des Proliferationsassays. Skalierung: 2mm.

Die Abbildung zeigt, dass die Plättchen mit höheren Bioglas-Anteilen weniger lichtdurchlässig sind als das reine Polylactid. Auch die Konturen des 3D-Druckes lassen sich schlechter differenzieren. Das bestätigt die Beobachtungen in den Abbildungen 4 A-D, dass das Bioglas

einen Einfluss auf die gedruckte Form des Materials hat. Die geringere Lichtdurchlässigkeit sorgt dafür, dass die 3D-Struktur in dieser 2D-Aufnahme schwieriger zu erkennen ist, was in die Beurteilung des Strukturvergleichs der verschiedenen Materialien mit einzubeziehen ist. Anhand der Menge der grün fluoreszierenden Zellen ist zu erkennen, dass es deutliche Unterschiede bezüglich der Zelldichte gibt. Im Verlauf der Aufnahmen, mit Zunahme des Bioglas-Anteils, ist eine Dichtezunahme der Zellen zu verzeichnen (Abb. 10 A-D).

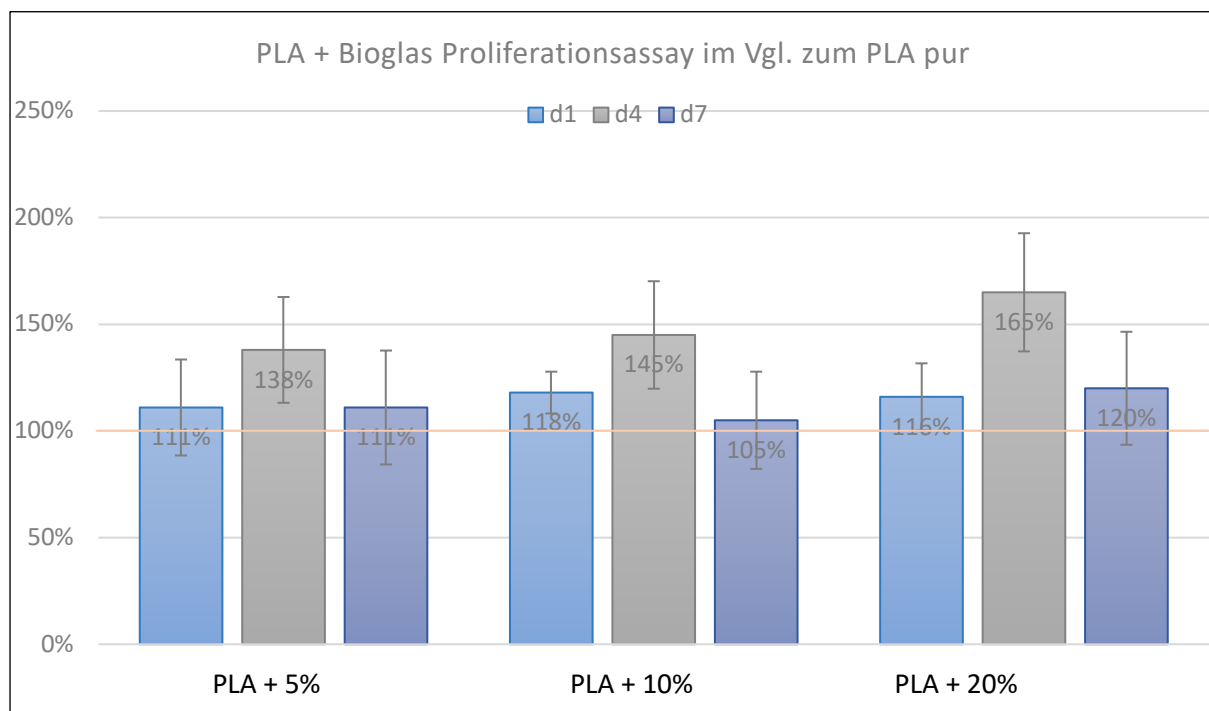


Abbildung 11: Prozentuale Ergebnisdarstellung des Proliferationsassays der HUVECs mit Bioglas im Vergleich zu den Zellen des reinen Poly lactids an Tag 1(d1), Tag 4(d4) und Tag 7(d7); Orange Linie = PLA pur (100%)

In Abbildung 11 sind die Ergebnisse des Proliferationsassays aufgeführt, in dem das Wachstum der Zellen auf den verschiedenen Bioglas-Modifikationen und dem reinen PLA untersucht und miteinander verglichen wurde. Den Daten aus Abb. 11 kann entnommen werden, dass die Werte der HUVECs des reinen Poly lactids an den Tagen 1 (d1), 4 (d4), und 7 (d7) immer auf 100% normiert sind. Die Ergebnisse der Zellen auf den Modifikationen wurden an den jeweiligen Tagen mit denen des reinen PLAs verglichen und daraus hat sich folgendes ergeben:

An allen Tagen ist bei allen Modifikationen ein erhöhtes Vorkommen an vitalen Zellen, im Vergleich zum reinen Poly lactid, zu erkennen. Die Ergebnisse liegen stets bei über 100%, auch wenn die Unterschiede teilweise nur gering sind. Den größten Unterschied gab es dabei an Tag 4 des Versuchs beim PLA+20%BG. An Tag 7 reduziert sich die Differenz der Zellen im Vergleich zum reinen PLA bei allen Bioglas-Proben.

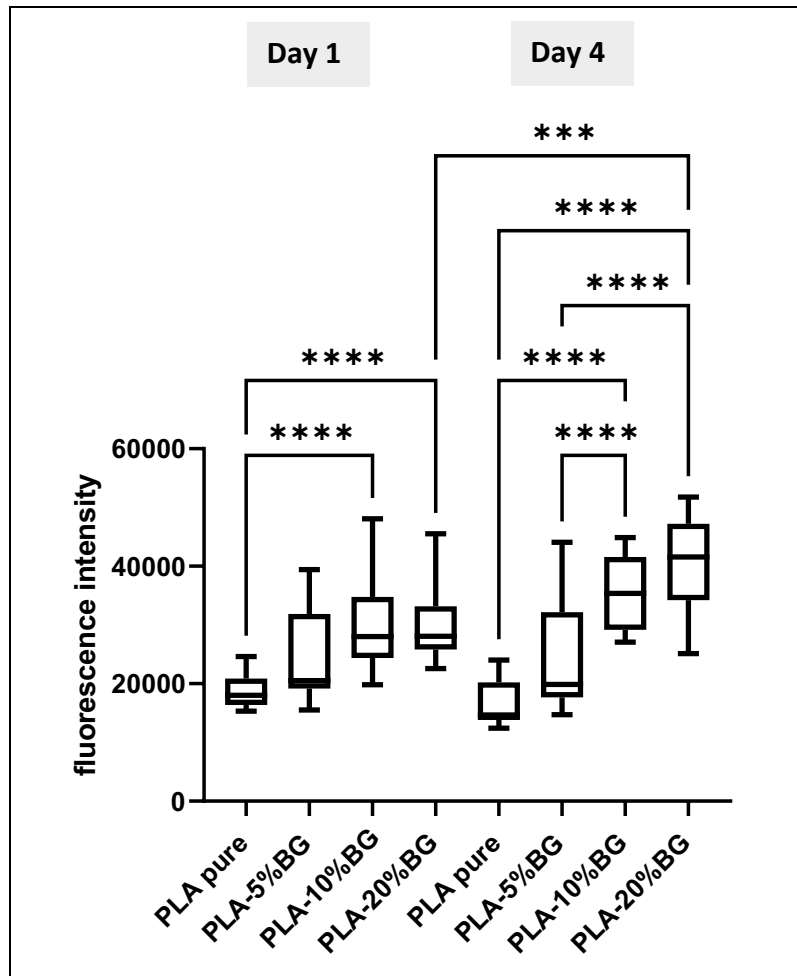


Abbildung 12: Proliferationsassay (alamarBlue™) von HUVECs auf PLA-BG Plättchen mit unterschiedlichen Modifikationen. Dargestellt ist die Menge lebensfähiger Zellen anhand der Fluoreszenzintensität an Tag 1 und Tag 4. Mann-Whitney U Test zeigt signifikante Unterschiede (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$; **** $P < 0.001$).

In der Abbildung 12 sind die Intensität der Fluoreszenz und die Signifikanzniveaus der HUVECs mit den verschiedenen Bioglas-Modifikationen an Tag 1 und Tag 4 dargestellt. Der Grafik ist zu entnehmen, dass mit steigendem BG-Anteil die Intensität der gemessenen Fluoreszenz zunimmt. Somit ergeben sich signifikante Unterschiede der Zellen auf den PLA+10%BG und PLA+20%BG im Vergleich zu den Zellen des reinen PLAs und an Tag 4 sogar zu denen des PLA+5%BG.

5.1.2 qPCR

In den Versuchen der qPCR wurde untersucht, ob das Bioglas einen Einfluss auf die Genexpression der Zellen hat. Es ist von Interesse, ob die Endothelzellen ihre spezifische Funktion auch in Anwesenheit von Bioglas ausführen können. Die Gene, die dabei untersucht wurden, sind spezifisch für Endothelzellen und wurden bereits unter Punkt 2.1.4 erläutert. In

der qPCR wurden zunächst CT-Werte erstellt, die zwar eine Tendenz erahnen ließen, aber für die Darstellung nicht optimal sind, da die Vergleichbarkeit fehlt. Deshalb wurden Δ CT-Werte genutzt, die die Differenz des Housekeeping-Gens und des Gene of Interest (GoI) darstellen (86). Die Methodik und die Rechnung wird von Rao et al. in seiner Arbeit erläutert (87).

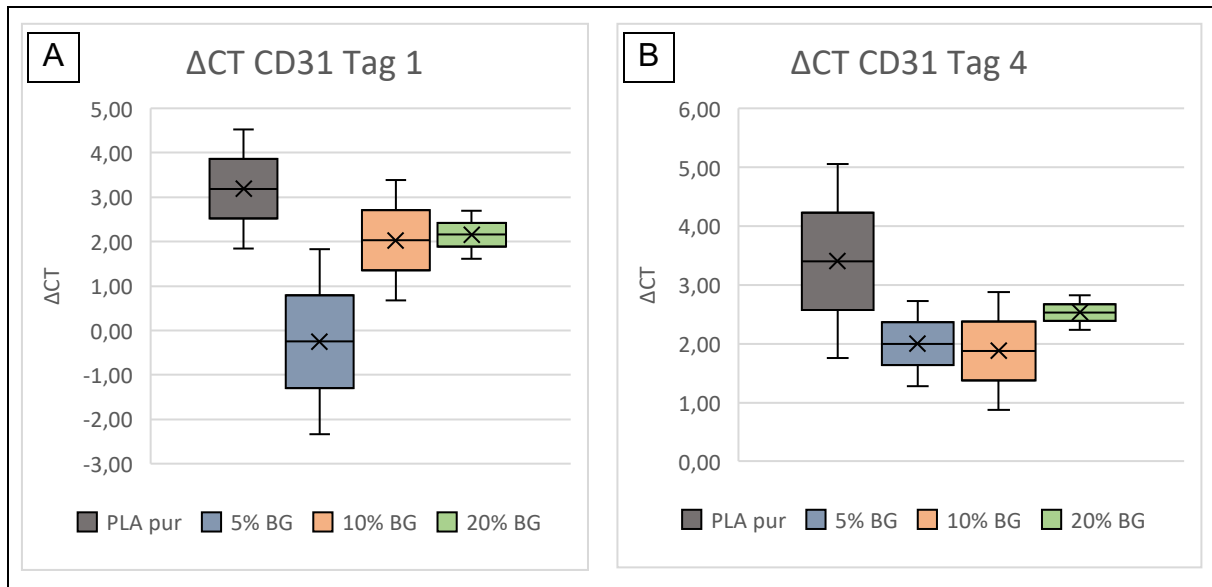


Abbildung 13: Genexpression von CD31 in den Endothelzellen nach Kultur auf PLA-BG Plättchen an Tag 1(A) und Tag 4(B)

Da das Housekeeping Gen in nahezu allen Zellen gleich exprimiert wird, werden die Ergebnisse durch dessen Einbeziehung in die verschiedenen Versuche, vergleichbar gemacht. Die Ergebnisse aus den Abbildungen 13-15 lassen sich wie folgt interpretieren:

Je höher der Δ CT-Wert in der y-Achse ist, desto größer ist die Differenz zwischen dem CT-Wert des Housekeeping-Gens und dem des GoI. Eine größere Differenz bedeutet, dass das GoI erst spät detektiert wurde und eine geringe Genexpression zeigt. In der Abbildung 13 lässt sich erkennen, dass der Δ CT-Wert der Zellen aus der Gruppe der BG-Modifikationen deutlich unter denen des reinen Polylactids liegt. Das bedeutet, dass das CD31 in den Zellen der BG-Modifikationen höher exprimiert ist. An Tag 4 ist der Unterschied noch stärker ausgeprägt. Auch in den Abbildungen zu den Genen der Zellen des KDR (Abb. 14 A+B) und des vWF (Abb. 15 A+B) sind die Ergebnisse ähnlich. Es fällt auf, dass bei allen Genen an Tag 1 die Unterschiede zwischen den 10%-BG- Δ CT-Werten und dem reinen Polylactid relativ gering sind. Erst an Tag 4 ist die zunehmende Differenz der Δ CT-Werte zum reinen PLA sichtbar. Das gilt nicht nur für das CD31 in Abbildung 13 B, sondern auch für das KDR in Abb. 14 B und den vWF in Abbildung 15 B. Bei den 20%-BG- Δ CT-Ergebnissen der HUVECs lässt sich nur beim vWF eine vermehrte Genexpression an Tag 4 verzeichnen. Im Gegensatz dazu zeigt die Genexpression der HUVECs beim PLA+5%BG in der qPCR aller Gene sehr gute Ergebnisse.

An Tag 1 sind die Δ CT-Werte stets niedriger als beim PLA+10%BG und PLA+20%BG und an Tag 4 haben sich die Ergebnisse der verschiedenen BG-Modifikationen wieder angeglichen.

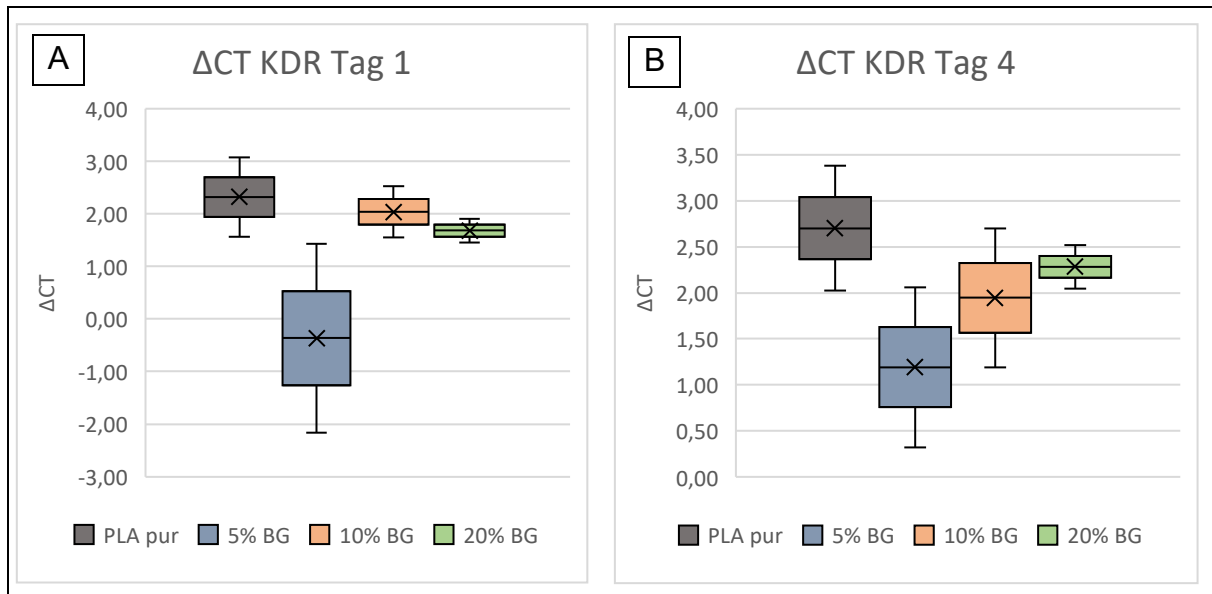


Abbildung 14: Genexpression von KDR in den Endothelzellen nach Kultur auf PLA-BG Plättchen an Tag 1(A) und Tag 4(B)

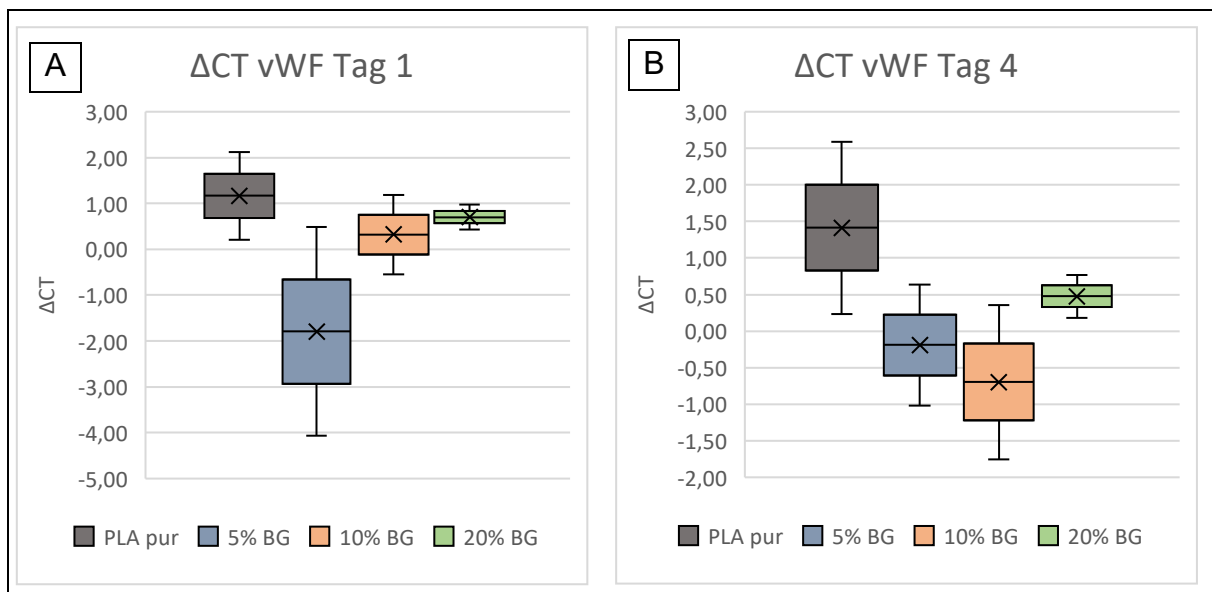


Abbildung 15: Genexpression von vWF in den Endothelzellen nach Kultur auf PLA-BG Plättchen an Tag 1(A) und Tag 4(B)

In der Abbildung 16 sind die Ergebnisse der qPCR als x-fache Expression dargestellt. Dafür wurden die Gene der Endothelzellen, die den PLA+10%BG und PLA+20%BG Plättchen ausgesetzt waren, mit den Genen der Zellen des reinen PLA verglichen. Aufgrund der Ergebnisse der anderen Versuche wurden die PLA+5%BG bei der x-fachen Expression nicht mit einbezogen. Dargestellt sind die Gene CD31 und KDR jeweils an Tag 1 und Tag 4. In der Abbildung 16 ist zu erkennen, dass die signifikanten Unterschiede hauptsächlich zwischen den

Gruppen des reinen PLAs und den Modifikationen bestehen. Zwischen den Gruppen der 10%BG- und 20%BG-Modifikationen gibt es, bis auf eine Ausnahme beim KDR, keine signifikanten Unterschiede, wobei die Tendenz mit leicht höherer x-facher Expression bei dem PLA+20%BG liegt.

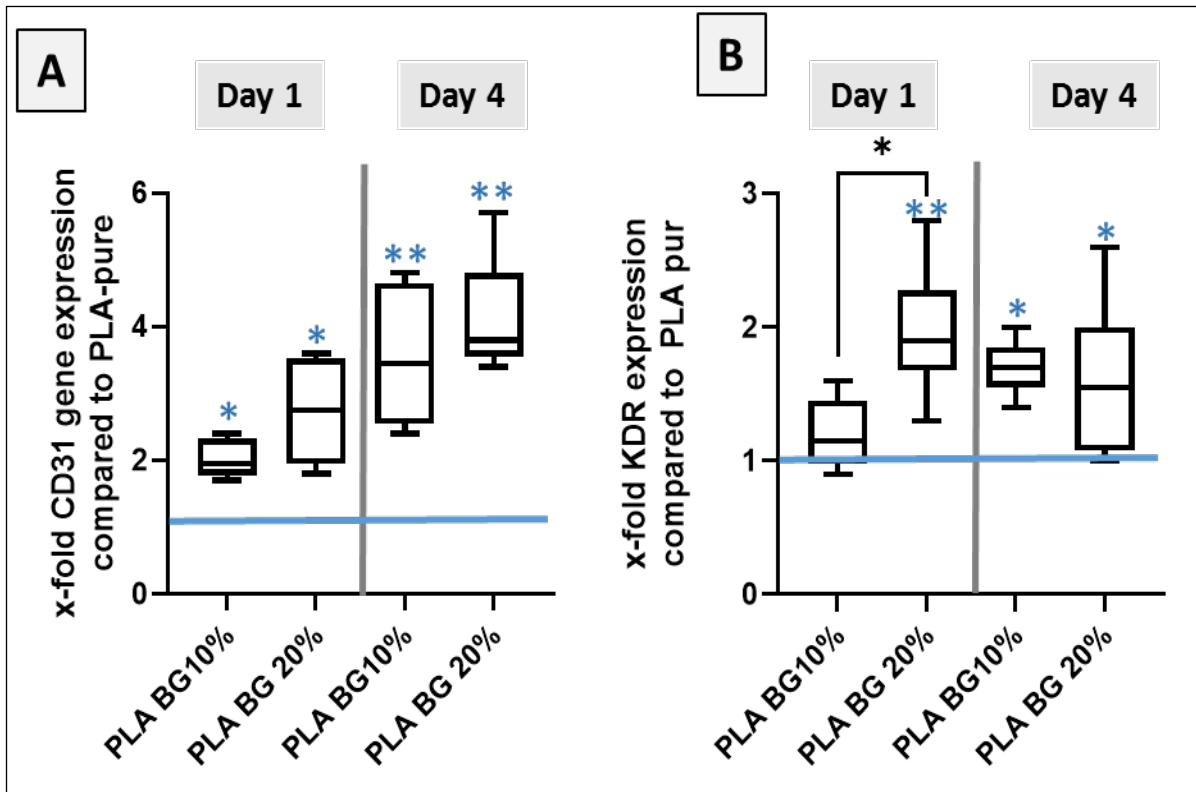


Abbildung 16: Genexpression von HUVECs auf PLA + 10%BG und PLA + 20%BG Plättchen an Tag 1 und Tag 4. Mann-Whitney U Test zeigt signifikante Unterschiede ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.005$; $****P < 0.001$). Schwarze Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen PLA + 10%BG und PLA + 20%BG. Blaue Sterne zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zum reinen PLA (blaue Linie = 1)

5.1.3 Matrigel®

Das Ziel dieser Versuche war es, zu untersuchen, ob das Bioglas während der Angiogenese einen Einfluss auf die Endothelzellen hat. Nach Einbettung in das Matrigel®, entwickeln die Zellen bereits nach 20-24 Stunden gefäßähnliche Strukturen, die in Abbildung 17 zu erkennen sind. Das Medium wurde vorab mit den jeweiligen PLA-Bioglas-Plättchen inkubiert, sodass die gelösten Stoffe einen Einfluss auf die Endothelzellen und damit auf die Angiogenese haben konnten. Die Auswertung dieser Bilder erfolgte mit ImageJ® und in Abbildung 18 ist die Analyse des Angiogenese Analyzers von ImageJ® dargestellt. Damit werden verschiedenste Anteile des Bildes ausgewertet und automatisch in Kategorien eingeordnet. Die für diese Arbeit interessanten Werte sind die Anzahl der Knotenpunkte bzw. Adhäsionskontakte (number of junctions), Anzahl der Segmente (number of segments) und die komplette Länge (total length) der gemessenen Formationen.

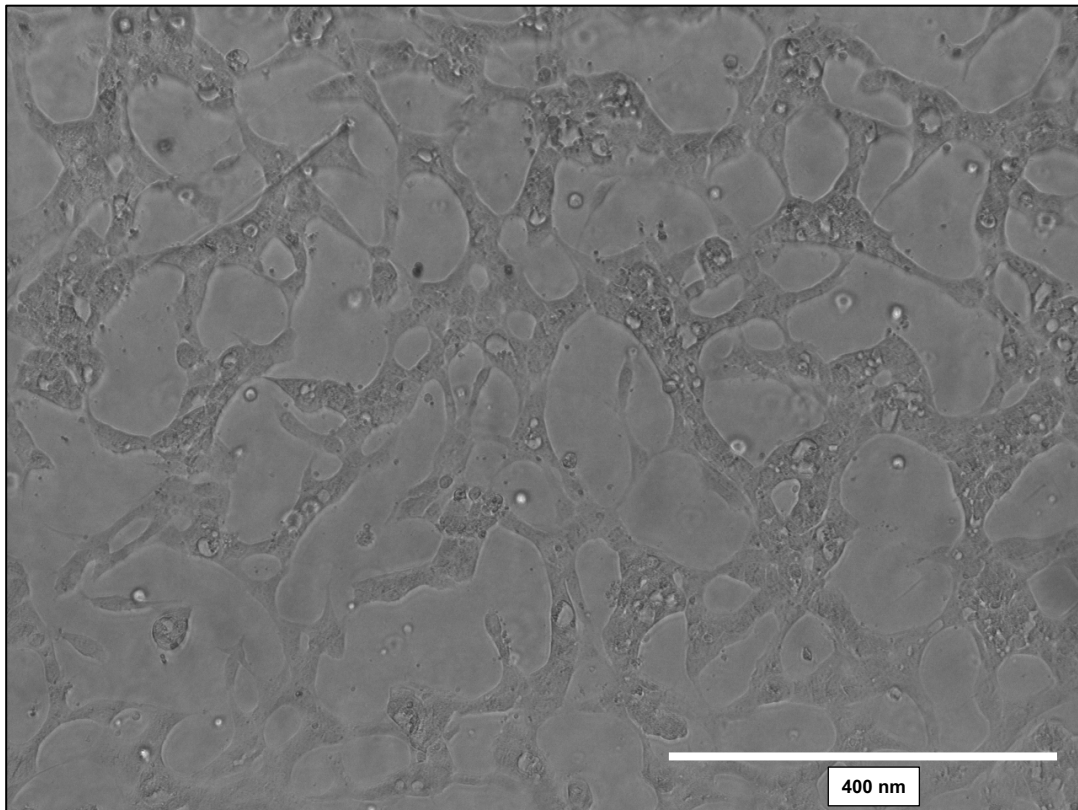


Abbildung 17: Angiogenese-Formationen der HUVECs beim Matrigel®-Versuch (PLA + 10% BG)

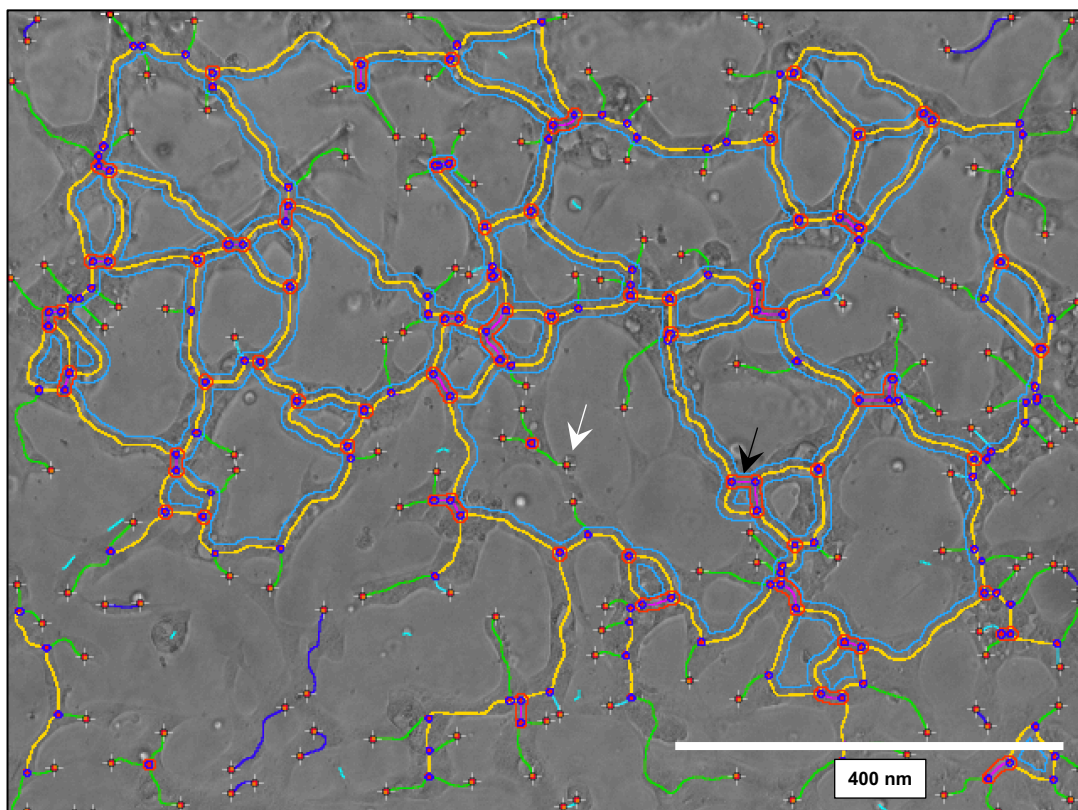


Abbildung 18: Matrigel® - Analyse der Abb. 17 mit ImageJ - Angiogenese Analyzer; Weißer Pfeil: Junction (Rote Punkte), Schwarzer Pfeil: Segment (Rosa Linien als Verbindung zwischen den Junctions)

In der Abbildung 19 A-C ist die Auswertung der Ergebnisse des Matrigel®-Versuchs aufgeführt. Eindeutig zu erkennen ist, dass die Zellen des reinen PLAs in allen Abbildungen die niedrigsten Werte aufzeigen. In Abbildung 19 A werden die „number (nb) of junctions“ dargestellt, die allerdings bei den Zellen des 5%-Bioglas noch keine Signifikanz zu den Zellen des reinen PLAs aufweisen. Aber bei den HUVECs des PLA+10%BG ist bereits ein signifikanter Unterschied messbar gewesen, der bei Zellen des PLA+20%BG noch einmal deutlich größer wird. Bei den „nb. of segments“ zeichnet sich ein ähnliches Ergebnis ab, wie in Abbildung 19 B dargestellt. Allerdings zeigen dort lediglich die HUVECs des PLA+20%BG einen signifikanten Unterschied, sowohl sehr deutlich zu den Zellen des reinen PLAs, als auch leicht zu denen des PLA+5%BG. Die Zellen des PLA+10%BG schneiden zwar besser ab als die des PLA+5%BG, aber befinden sich bei den „nb. of segments“ dennoch nicht im Signifikanzniveau. Die Ergebnisse von Abb. 19 A und B ähneln sich deshalb, weil Junctions und Segmente unmittelbar zusammenhängen. Ein Segment ist ein Teil der Formation, welches über die Junctions noch mit anderen Segmenten oder mit kleineren Ästen (branches) verbunden ist (Abb. 18). Das sind Gebilde mit Lumen, die eine Vorstufe der Gefäße darstellen und einen wesentlichen Teil des späteren Gefäßnetzes bilden. Die „total length“ in Abb. 19 C ist somit auch von Interesse und hängt mit den vorherigen Ergebnissen zusammen. Die Ausprägung dieser gefäßähnlichen Formationen bei der Angiogenese steigt auch hier mit zunehmendem Bioglas-Anteil. Die signifikanten Unterschiede bei der „total length“ sind identisch wie die der „nb. of junctions“ in Abbildung 19 A. HUVECs unter Einfluss von PLA+20%BG zeigen den deutlichsten Unterschied zu Zellen des reinen PLAs und erzielen damit in allen aufgeführten Parametern dieses Versuchs die besten Ergebnisse.

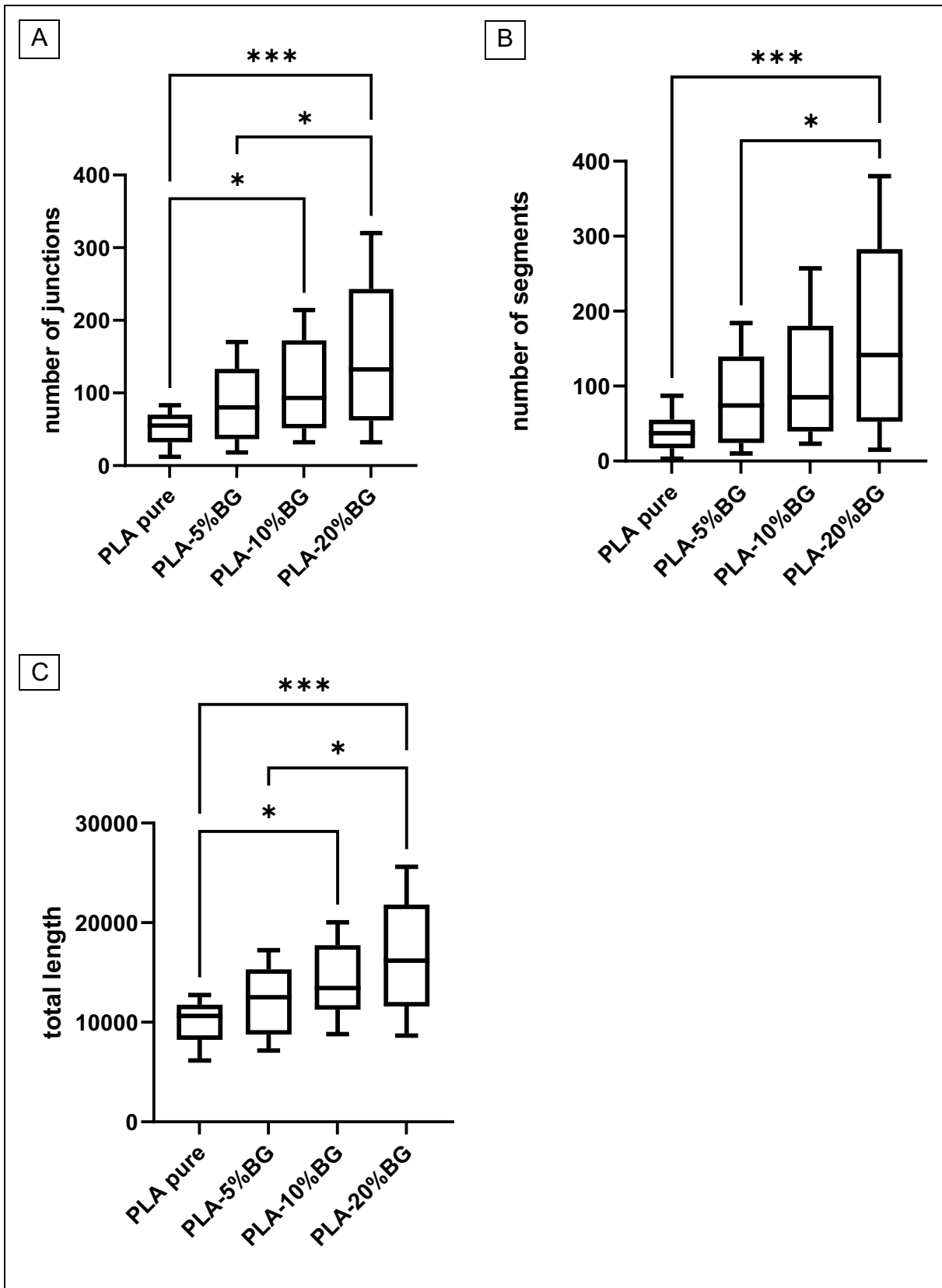


Abbildung 19: Matrigel® - Auswertung (A: nb. of junctions, B: nb. of segments, C: total length). Alle drei Analysen zeigen eine erhöhte Angiogenese der HUVECs bei steigendem Bioglas-Anteil. Mann-Whitney U Test zeigen signifikante Unterschiede (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005; ****P < 0.001).

5.1.4 CAM-Assay

Beim CAM-Assay wurde der Einfluss der Bioglas-Plättchen auf die Vaskularisierung der Chorioallantois-Membran untersucht. Aufgrund der vorherigen Ergebnisse wurden nur die Bioglas-Modifikationen mit 10% und 20% in die Versuche eingeschlossen. In den Abb. 20-22 sind die Plättchen mit umliegender CAM und deren Gefäßen unter dem Mikroskop dargestellt. In Abbildung 20 ist ein Plättchen des reinen PLAs zu sehen, welches im gesamten Bildausschnitt eine ausgeprägte Vaskularisierung aufweist. Aufgrund der Transparenz des Plättchens lassen sich auch die Gefäße unterhalb beurteilen.

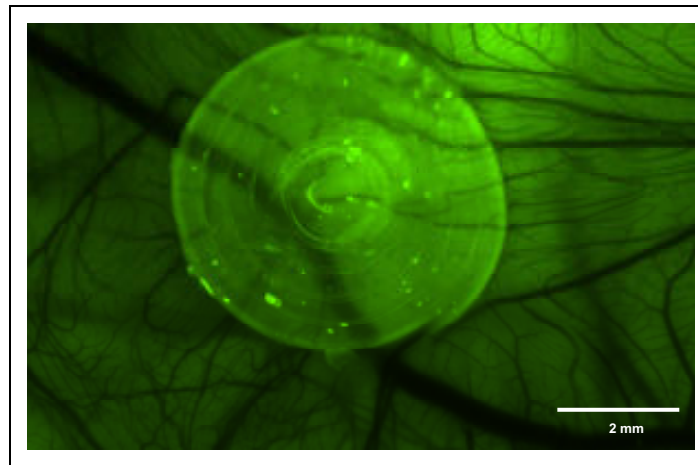


Abbildung 20: CAM – Assay. Beispielhafte Darstellung von PLA pur an Tag 7

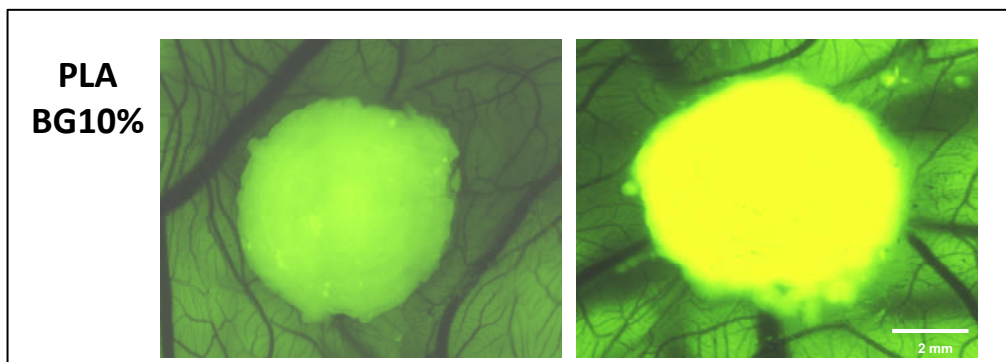


Abbildung 21: CAM – Assay. Beispielhafte Darstellung von PLA + 10%BG an Tag 7

In den Abbildungen 21 und 22 sind die Bioglas-Modifikationen mit 10% und 20% auf der CAM dargestellt. Im unmittelbaren Umfeld um die Plättchen zeichnet sich bei den Bioglas-Modifikationen eine bestimmte Ausrichtung der Gefäße ab. Diese richten sich peripher zunächst direkt in Richtung der Plättchen aus. Im zentralen Bildausschnitt hingegen, nahe den Modifikationen, richten sich einige Gefäße parallel zum Plättchen aus und bilden kollaterale Verbindungen mit anderen Gefäßen (Abb. 22: weiße Pfeile).

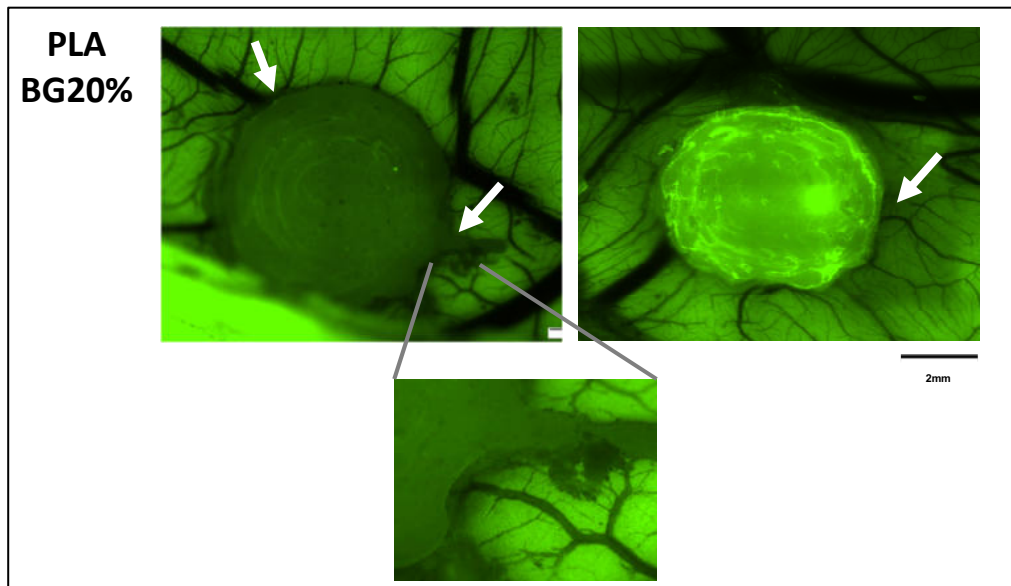


Abbildung 22: CAM – Assay. Beispielfhafte Darstellung von PLA + 20%BG an Tag 7

Im Ausschnitt der Abbildung 22 ist die Ausrichtung der Gefäße vergrößert dargestellt, in der auch die kleinsten Äste des Gefäßnetzes beurteilt werden können. Bei einer Aufnahme eines Plättchens mit 10% Bioglasanteil konnte noch eine interessante Beobachtung gemacht werden. Da diese Plättchen sehr klein und fragil sind, kann es bei der Bearbeitung auch zu kleinen Brüchen im Material kommen. Sowohl bei mechanischer Einwirkung als auch durch Abbauprozesse bei Kontakt mit Medium und Zellen. Das ist bei dem 10% Bioglas-Plättchen in Abb. 23 passiert. Es konnte beobachtet werden, wie die Gefäße scheinbar auf das Plättchen proliferieren bis zu dem Punkt, wo die Dicke des Plättchens wieder zunimmt. Eine solche Beteiligung an der Vaskularisierung konnte beim reinen PLA nicht beobachtet werden.

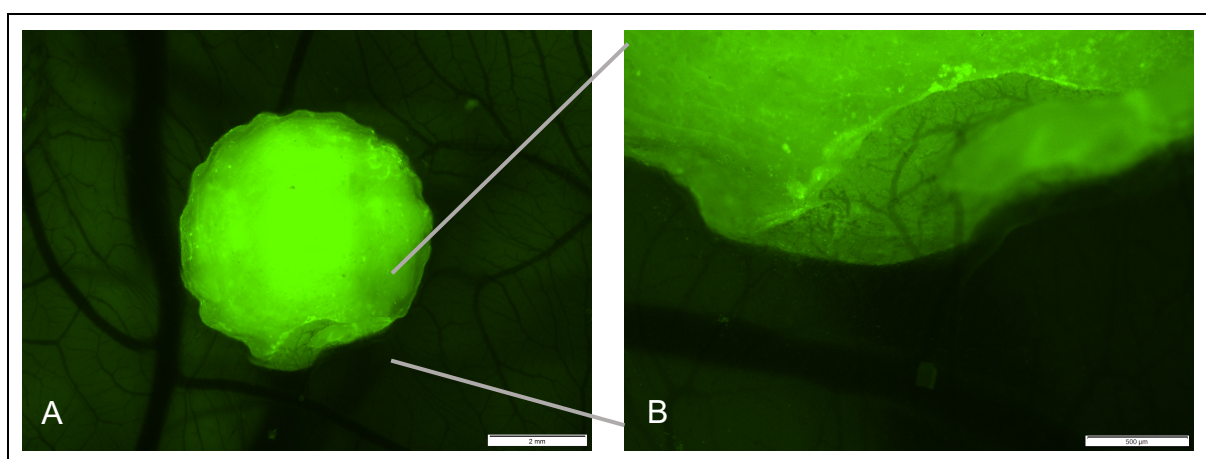


Abbildung 23: CAM – Assay. PLA + 10%BG an Tag 7. Skalierung: 2mm (A) und 500µm (B).

In Abbildung 24 A und B sind die PLA+20% Bioglas-Plättchen im zeitlichen Verlauf dargestellt. Gezeigt ist der Zustand an Tag 3 (Abb. 24 A) und Tag 5 (Abb. 24 B). Auch wenn die Helligkeitseinstellungen sichtbar unterschiedlich sind, kann dennoch ein Unterschied in der Gefäßentwicklung ausgemacht werden. Das Wachstum der Gefäße in diesen 2 Tagen ist deutlich. Nicht nur das Dickenwachstum der größeren Gefäße, sondern auch die Feinverzweigung der Endäste sind beachtlich. Vor allem im direkten Umfeld um das Plättchen scheint die Aufzweigung der Gefäße zuzunehmen. Auch der Verlauf der Gefäße richtet sich wieder zu den Plättchen hin aus, wie schon bei den vorherigen Abbildungen.

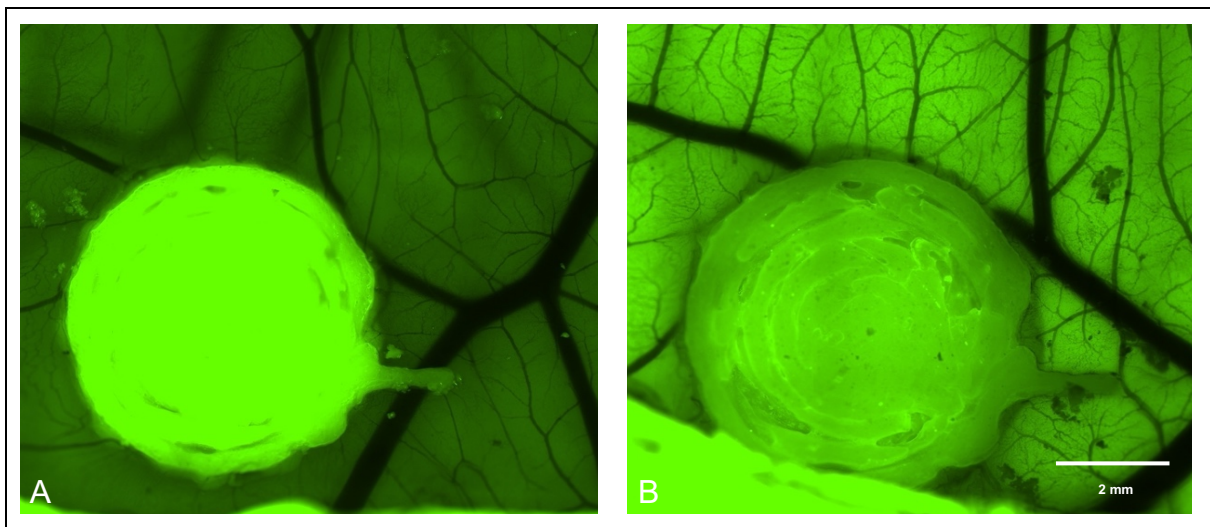


Abbildung 24: CAM – Assay. PLA + 20%BG an Tag 3(A) und Tag 5(B)

In der Abbildung 25 sind die Ergebnisse des CAM-Versuchs der reinen PLA-Plättchen und der PLA+BG-Modifikationen mit 10% und 20% dargestellt. Verglichen wird die Gefäßdichte zwischen Tag 0 (d0) und Tag 7 (d7) in Prozenten. Dadurch kann indirekt das Gefäßwachstum innerhalb einer Woche dargestellt werden. Die Auswertung stammt u.a. aus den Abbildungen, die oben bereits beschrieben wurden und die Durchführung erfolgte mittels GraphPad Prism®. Der Unterschied nach 7 Tagen liegt beim reinen PLA bei ca. 11%, was nur für eine geringe Dichtezunahme nach einer Woche spricht. Im Gegensatz dazu stellt sich mit steigendem Bioglasanteil ein größerer Unterschied dar. Das PLA+10% Bioglas zeigt im Mittel eine um ca. 50% erhöhte Gefäßdichte im direkten Umfeld. Einen signifikanten Unterschied gibt es allerdings erst in der Gruppe des PLA+20%BG. Dort zeigt sich nach 7 Tagen ein hochsignifikanter Unterschied sowohl zur Gruppe des PLA+10%BG, als auch zu der des reinen PLAs mit einer Dichtezunahme um mehr als das 3-fache.

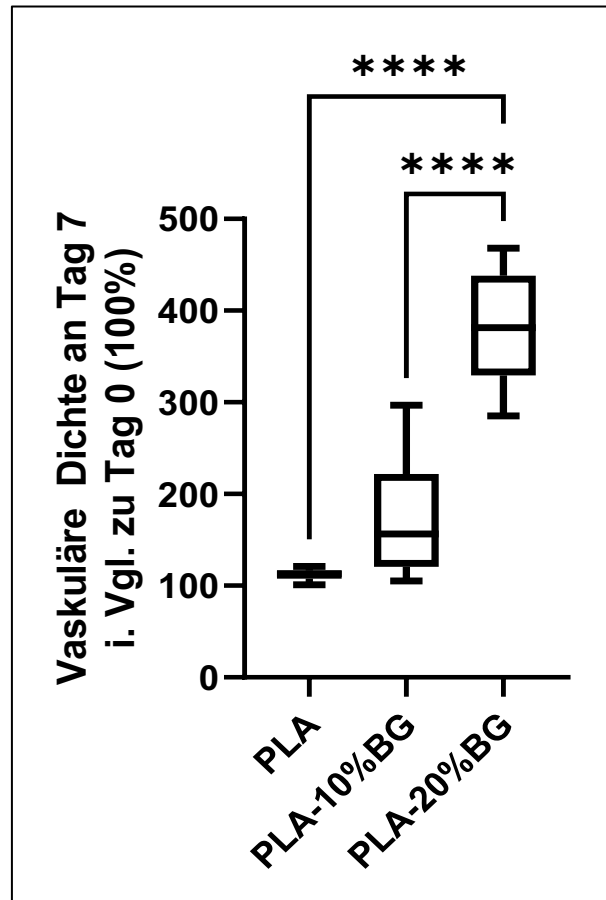


Abbildung 25: CAM-Auswertung: Vergleich der Gefäßdichte (d0 + d7). Mann-Whitney U Test zeigt signifikante Unterschiede (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$; **** $p < 0.001$).

5.2 Chitosan

5.2.1 Proliferationsassay

Im Rahmen der Versuche zum Chitosan wurden Proliferationsassays durchgeführt und fluoreszenzmikroskopische Bilder angefertigt. Es wurden virustransduzierte Osteoblasten mit GFP genutzt, die in den Abbildungen 26 und 27 an Tag 7 des Versuchs auf den verschiedenen Plättchen zu erkennen sind.

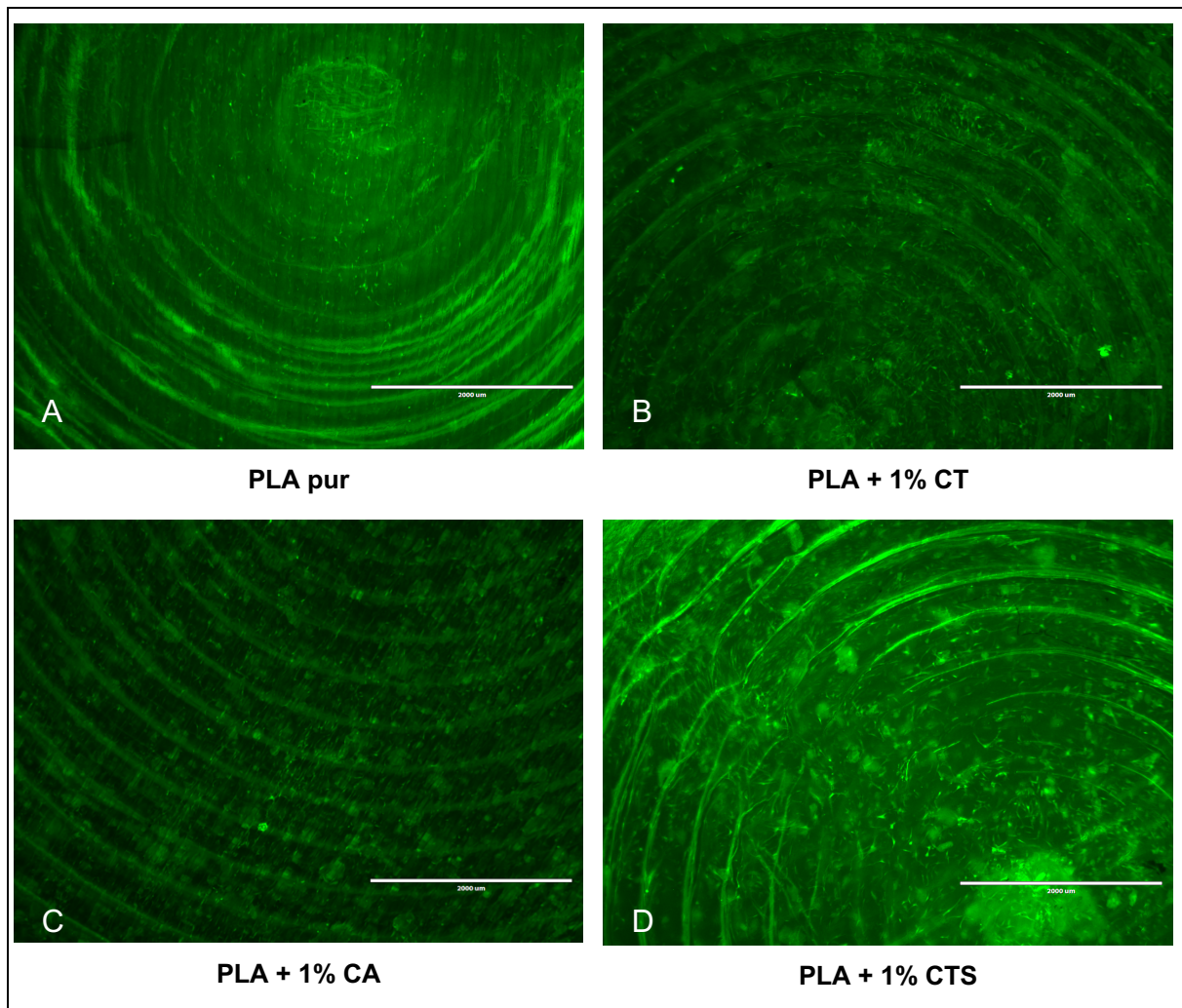


Abbildung 26: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der hOBs auf PLA-Plättchen mit unterschiedlichen Chitosan-Modifikationen an Tag 7. Skalierung 2 mm.

Die Unterschiede der Zelldichte auf dem reinen PLA-Plättchen und den 1%-Modifikationen sind auf den ersten Blick gering. Deutlich vermindert scheint die Dichte der Zellen aber in Abbildung 27, beim PLA+4%CTK und PLA+10%CT zu sein. In der Abbildung 28 sind die humanen Osteoblasten auf den Chitosan-Modifikationen im Vergleich zu den hOBs des reinen PLAs, das mit 100% festgelegt wurde, dargestellt. An Tag 1 der Messungen, scheint es bis auf ein paar Schwankungen, keinen größeren Unterschied zwischen den Zellen des reinen PLAs und denen der Modifikationen zu geben.

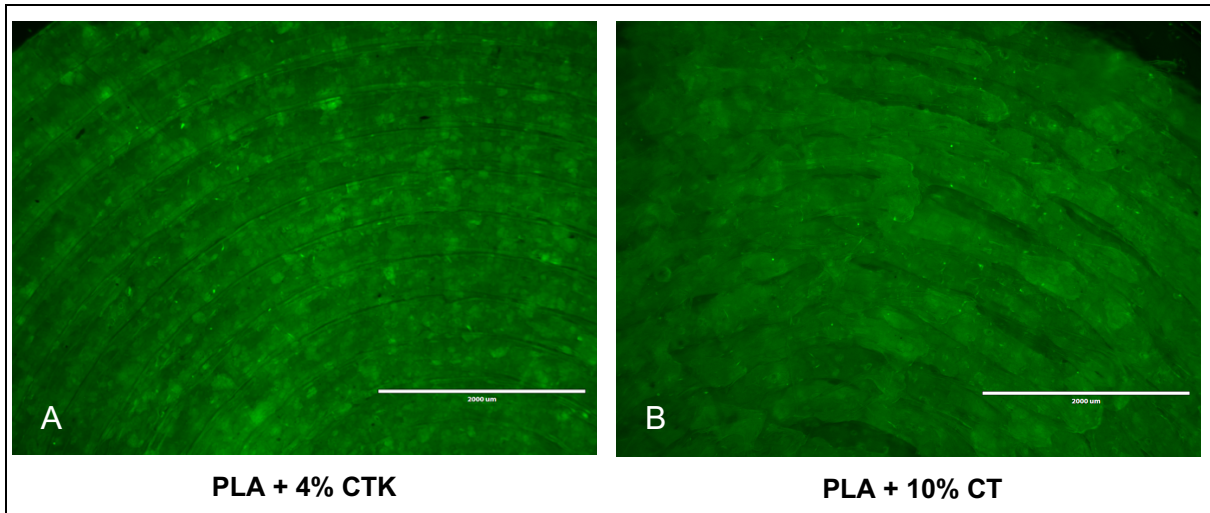


Abbildung 27: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der hOBs auf PLA-Plättchen mit unterschiedlichen Chitosan-Modifikationen an Tag 7. Skalierung: 2mm.

Die größte Abweichung zeigt dort das PLA+4%CTK, welches an Tag eins 19% weniger vitale Zellen aufweist und damit eine geringere Proliferation als beim reinen PLA nachgewiesen wurde. Bis zum Tag 4 allerdings hat sich die Differenz der Zellen der 1%-Modifikationen zu denen des reinen PLAs erhöht. An Tag 7 ist die Differenz aber nicht weiter gestiegen, sondern sogar wieder gesunken. Das geht teilweise so weit, dass das reine PLA sogar eine höhere Anzahl vitaler Zellen in der photometrischen Messung aufweist als z.B. die Modifikationen PLA+1%CT und PLA+1%CA. Bei den Zellen des PLA+4%CTK bleiben die Ergebnisse stets unter denen des reinen PLAs. Auch bei den Osteoblasten auf PLA+10%CT konnten nur geringe Unterschiede ohne Signifikanz festgestellt werden.

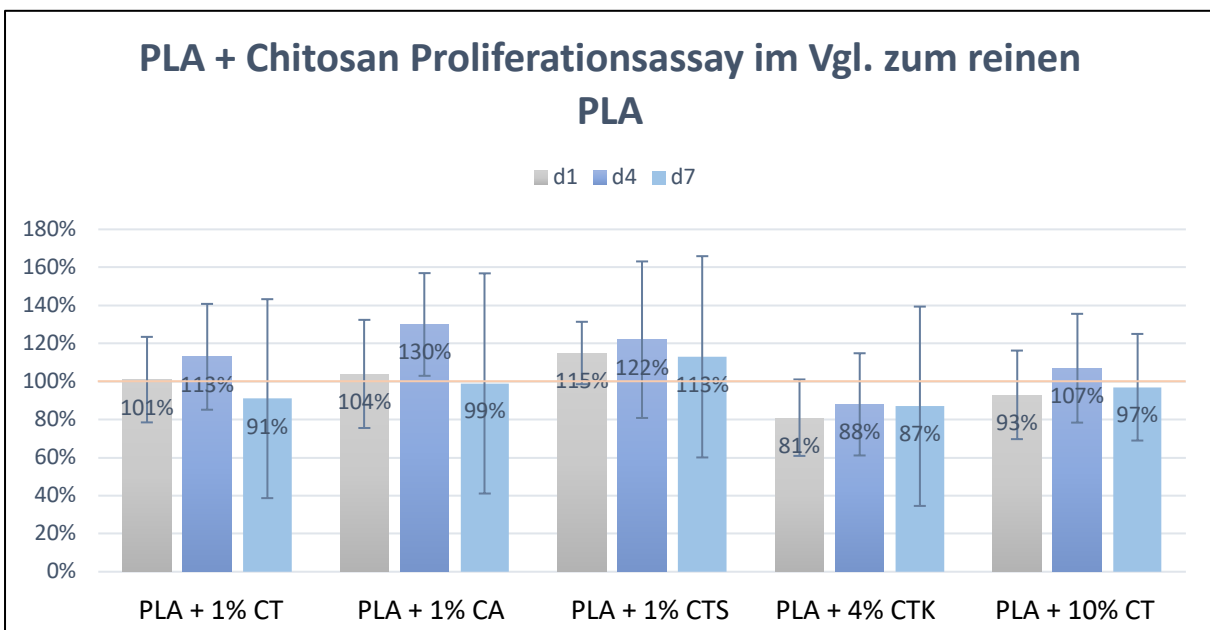


Abbildung 28: Prozentualer Vergleich der Proliferation der hOBs auf den Chitosan-Modifikationen und auf reinem PLA (Orange Linie bei 100%) an Tag 1 (d1), Tag 4 (d4) und Tag 7 (d7).

5.2.2 qPCR

Es wurde untersucht, wann die spezifischen Gene für die Osteoblasten, die den verschiedenen Plättchen ausgesetzt waren, detektiert wurden und haben diese Daten miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind bei den unterschiedlichen Genen, die untersucht wurden, ähnlich ausgefallen. Die Gruppe des PLA+4%CTK wurde aufgrund der bisherigen Ergebnisse nicht in die Versuche miteingeschlossen. In den Abbildungen 29-31 sind die durchweg niedrigen Δ CT-Werte beim PLA-pur im Vergleich zu denen der Modifikationen zu erkennen. In den Abbildungen 29 A, 30 A und 31 A sind die Ergebnisse der qPCR an Tag 1 mit den drei untersuchten Genen dargestellt. Es gibt an Tag 1 des Versuchs keine Chitosan-Modifikation, bei der die Gene früher detektiert wurden als beim reinen PLA. Ausnahmen gibt es allerdings an Tag 4. Dort kann beim OPN (Abb. 29 B) beobachtet werden, dass das Δ CT bei den Gruppen des PLA+1%CA und des PLA+10%CT leicht niedriger ausfällt als beim reinen PLA, auch wenn es kein signifikanter Unterschied ist.

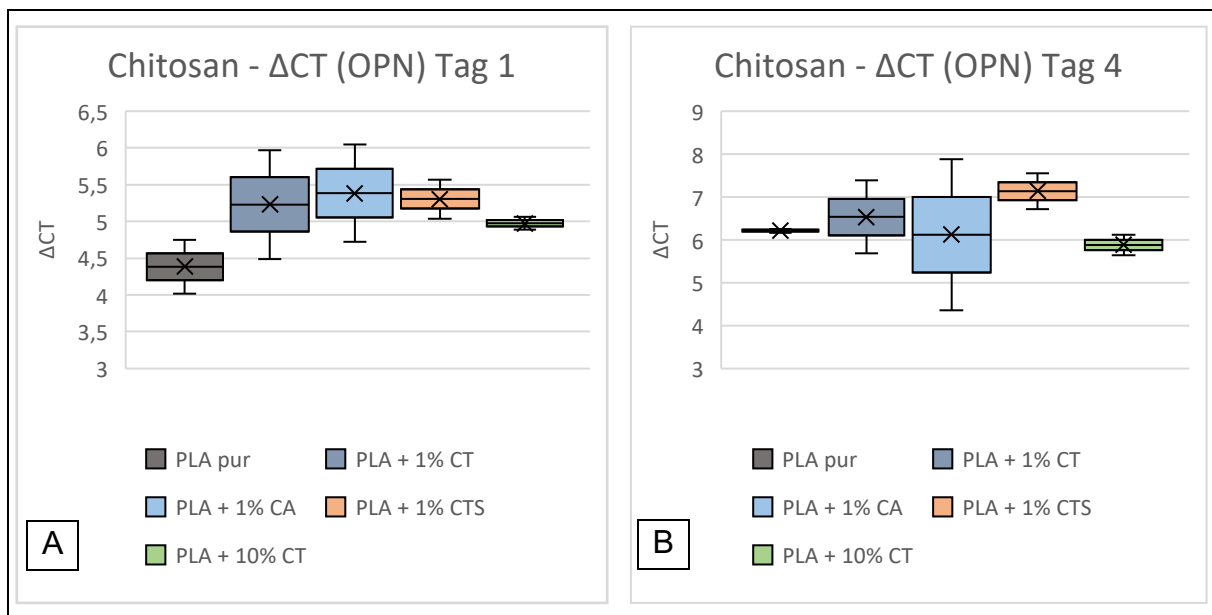


Abbildung 29: Genexpression von OPN in humanen Osteoblasten nach Kultur auf PLA-Chitosan Plättchen an Tag 1(A) und Tag 4(B)

Auch beim Δ CT für das RUNX2-Gen an Tag 4 (Abb. 30 B) kann ähnliches bei den Gruppen des PLA+1%CTS und des PLA+10%CT beobachtet werden. Die Δ CT-Werte des SPARC-Gens sind sowohl an Tag 1 (Abb. 31 A) als auch an Tag 4 (Abb. 31 B) stets oberhalb des reinen PLAs. Sämtliche Versuchsergebnisse zur qPCR und den unterschiedlichen Genen weisen keinerlei signifikante Unterschiede auf.

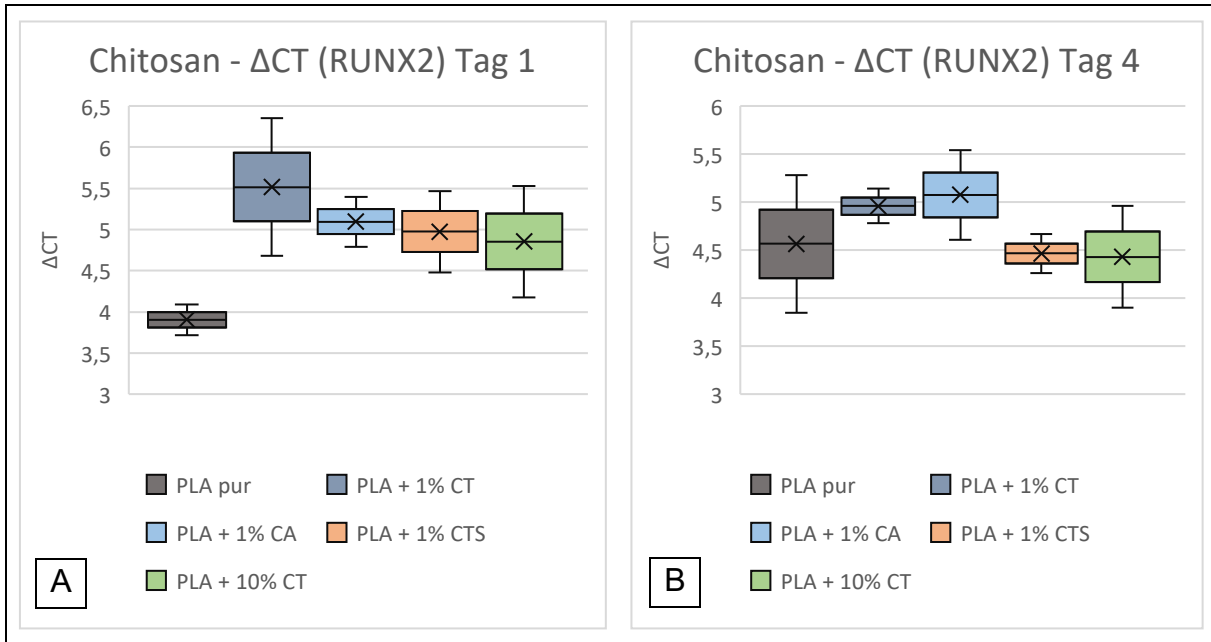


Abbildung 30: Genexpression von RUNX2 in humanen Osteoblasten nach Kultur auf PLA-Chitosan Plättchen an Tag 1(A) und Tag 4(B)

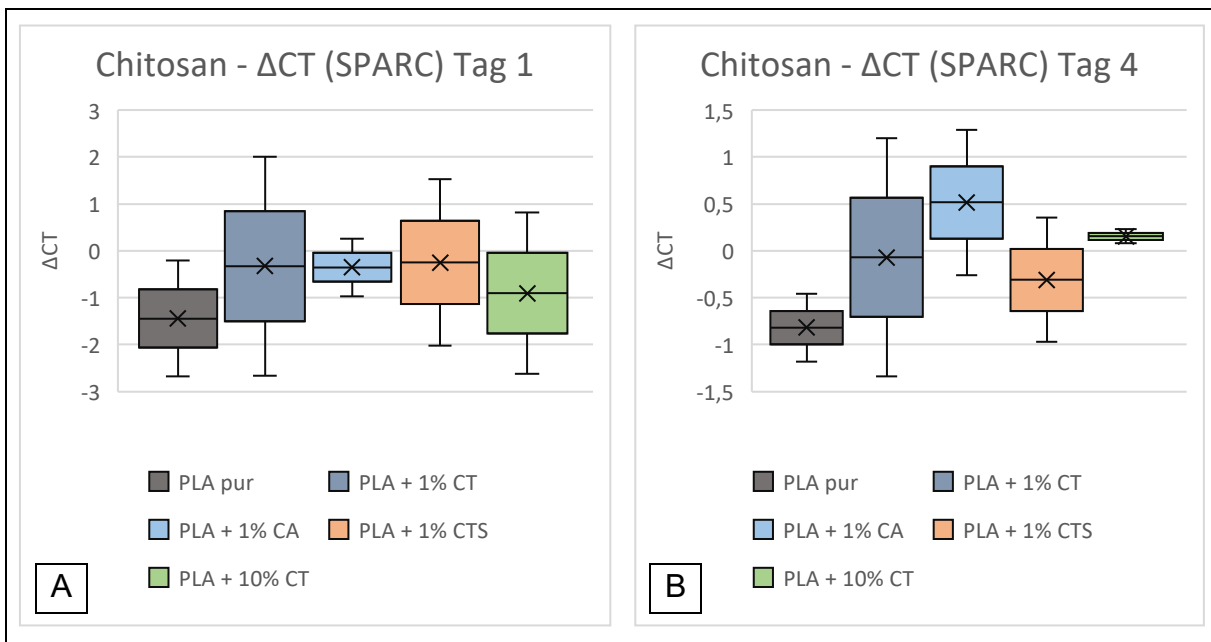


Abbildung 31: Genexpression von SPARC in humanen Osteoblasten nach Kultur auf PLA-Chitosan Plättchen an Tag 1(A) und Tag 4(B)

5.2.3 Zytotoxizitätsassay

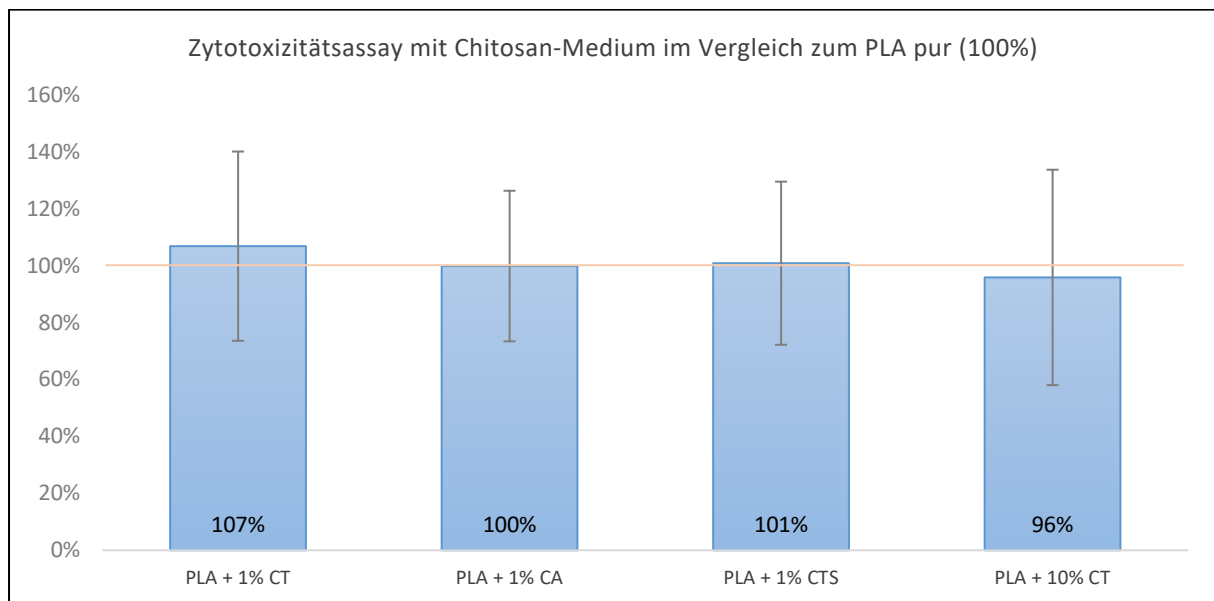


Abbildung 32: Zytotoxizitätsassay mit Fibroblasten im Chitosan-Medium und Vergleich zum reinen PLA; Orange Linie: PLA pur 100%.

Aufgrund der vorherigen Ergebnisse wurde die Zytotoxizität des Chitosans mittels dieses Assays untersucht. Die Abbildung 32 zeigt die Wirkung des Chitosans auf die Fibroblasten im Vergleich zum reinen Polylactid. Das PLA pur setzt den Standard bei 100% und ist mit den Chitosan-Derivaten verrechnet. In der Abbildung ist zu erkennen, dass es minimale Unterschiede bei den Fibroblasten mit PLA+1%CT gibt. Dabei ist eine 7% höhere Anzahl an vitalen Zellen beim PLA+1%CT gemessen worden. Bei den Zellen des PLA+1%CA gibt es keinen und bei denen des PLA+1%CTS nur einen sehr geringen Unterschied im Vergleich zu den Fibroblasten des reinen PLAs. Die Anzahl an vitalen Zellen ist beim PLA+10%CT sogar 4% geringer als beim reinen Polylactid. Es ist zu erwähnen, dass diese geringen Unterschiede bei sämtlichen Derivaten keine statistische Signifikanz aufweisen.

6 Diskussion

6.1 Bioglas

Diese Arbeit befasste sich mit der Untersuchung von Zellen unter Einfluss von 3D-gedruckten Plättchen aus Polylactid in Kombination mit Bioglas oder Chitosan. Das PLA ist seit Jahren Bestandteil der Forschung und es hat sich gezeigt, dass es sich durch die gute Biokompatibilität und die Biodegradierbarkeit hervorragend als Trägermaterial für verschiedenste Stoffe eignet (88, 89). Die bisherige Forschung zur Zytotoxizität zeigte, dass das PLA keinen negativen Einfluss auf die Zellen hat (90). Dadurch ist das PLA ein geeignetes Ausgangsmaterial für das Tissue Engineering und den 3D-Druck. Es diente in dieser Arbeit in der Reinform der Negativkontrolle gegenüber den modifizierten Materialien.

6.1.1 Proliferationsassay

Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Bilder die im Rahmen des alamarBlue™ Proliferationsassays angefertigt wurden, lässt sich bereits eine Vermutung über das Verhalten der Zellen unter BG-Einfluss anstellen. Aufgrund der GFP-Expression der HUVECs kann die Dichte der Zellen auf den Plättchen sehr gut beurteilt werden. Die Zunahme der Zelldichte korreliert mit dem steigenden Anteil des Bioglases der Plättchen. Bei den Modifikationen mit 5% BG-Anteil, im Vergleich zum reinen PLA, ist bereits eine höhere Zelldichte zu erkennen, die allerdings beim PLA+10%BG und PLA+20%BG noch weiter zu steigen scheint. Das bekräftigt den Verdacht eines Zusammenhangs zwischen Zellwachstum und BG-Konzentration. Diese Beobachtung wurde quantitativ anhand des Proliferationsassays verifiziert (Abb. 11 und 12). Schon an Tag 1 des Assays ist in Abbildung 12 eine höhere Zelldichte bei den Bioglas-Modifikationen messbar gewesen, auch wenn der Unterschied zu den Zellen des reinen PLAs lediglich bei den Gruppen PLA+10%BG und PLA+20%BG signifikant ist. Der deutlichere Unterschied zur Gruppe des reinen PLA und auch zwischen den Modifikationen selbst zeigt sich an Tag 4. Denn dort ist auch eine hohe Signifikanz mit einem $p < 0,001$ der Gruppen mit 10% und 20% BG-Anteil im Vergleich zur Gruppe mit PLA+5%BG zu verzeichnen. Sogar die Gruppe des PLA+20%BG, beim Vergleich von Tag 1 und 4, zeigt eine Signifikanz von $p < 0,005$, was dafürspricht, dass im Verlauf der Zeit die positiven Effekte des Bioglases auf die Zellen noch stärker zunehmen. An Tag 4 sind auch die fluoreszenzmikroskopischen Bilder aus der Abbildung 10 entstanden, bei denen sich die zunächst optische Einschätzung der zunehmenden Zelldichte durch die Messergebnisse validieren lässt. Daraus lässt sich ableiten, je höher der Bioglas-Anteil ist, desto vorteilhafter wirkt sich das auf die Proliferation der Zellen aus. Allerdings setzt sich das an Tag 7 nicht genauso fort. In der Abbildung 11 ist zu erkennen, dass an Tag 7 die Dichte der Zellen im Vergleich zum reinen PLA wieder abzunehmen scheint. Das kann z.B. damit

zusammenhängen, dass das Wachstum auf dem reinen Polylactid zugenommen hat, während es bei den Zellen der Bioglas-Plättchen stagniert. Der Grund dafür könnte ein Platzmangel auf den Plättchen sein, der aufgrund der anfangs schnellen Proliferation früh erreicht ist. Ein Platzmangel würde dazu führen, dass die Zellen anfangen übereinander zu wachsen und der Zugang zum Medium für einige Zellen erschwert wäre. Dadurch kommt es zum Zelluntergang und zur Stagnation in der Proliferation. Die Folge daraus wäre die Annäherung der Zellzahl des reinen PLAs an die Zellzahl der Modifikationen, also eine Abnahme der Differenz, welche an Tag 7 gut zur Abbildung 11 passen würde. Dementsprechend ist vor allem der Unterschied von Tag 1 zu Tag 4 zu beachten, der für einen großen Vorteil zugunsten des Bioglasses spricht. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit anderen Studienergebnissen die bisher gemacht wurden, in denen auch gezeigt werden konnte, dass es bei HUVECs in Co-Kultur mit hOBs unter Einfluss von Bioglas zu einer signifikanten Steigerung der Proliferation im Vergleich zu herkömmlichen Hydroxyapatit (HA)-Grüsten kommt (91). Auch in vivo an Mäusen wurden PLA-BG-Gerüste untersucht und es konnte ebenfalls eine verbesserte Vaskularisierung des Implantatbettes durch das Bioglas festgestellt werden (92).

6.1.2 qPCR

Durch die qPCR wurde untersucht, welchen Einfluss das BG auf die Genexpression der Zellen hat. Dabei wurden die Gene CD31, KDR und vWF untersucht. Den Ergebnissen aus den Abbildungen 13-15 ist zu entnehmen, dass es in Bezug auf den Einfluss auf die Genexpression deutliche Unterschiede zwischen dem reinen PLA und den Bioglas-Modifikationen gab. Vor allem hat sich eine Zunahme der Differenz im Verlauf der Zeit von Tag 1 zu Tag 4 gezeigt, so wie es schon bei dem Proliferationsassay beobachtet werden konnte. Das würde bedeuten, je länger die Zellen dem Bioglas ausgesetzt sind, desto eher wirkt es sich positiv auf die Genexpression der Zellen aus. Die zellspezifische Funktion könnte sich im Verlauf der Zeit weiter verbessern, über die Zeit der Versuche in dieser Arbeit hinaus. Deb et al. zeigte in Versuchen mit Bioglas (S45P4), die über einen Zeitraum von 28 Tagen durchgeführt wurden, durchgehend eine verbesserte Proliferation von hOBs im Vergleich zu herkömmlichen HA-Gerüsten, was diese Vermutung stützt (91). In der Abbildung 16 ist die x-fache Expression der Gene CD31 und KDR von den Endothelzellen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass zwischen den Gruppen der 10%- und 20%-BG-Modifikationen kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Genexpression besteht. Einzige Ausnahme bildet hier die KDR-Genexpression an Tag 1 (Abb. 16 B), da dort die Gruppe des PLA+10%BG sehr nah an dem Ergebnis der Gruppe des reinen PLAs liegt und somit ein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen den Gruppen des PLA+10%BG und PLA+20%BG zu beobachten war. Zwischen dem reinen PLA und den Modifikationen konnten hingegen signifikante Unterschiede festgestellt werden, was für einen deutlichen Vorteil des BGs in Bezug auf die spezifische Zellentwicklung spricht. Von

ähnlichen Ergebnissen wurden bereits durch Aguirre et al. berichtet, dort wurden allerdings endotheliale Vorläuferzellen verwendet. Die Auswirkung des bioaktiven Glases in seiner Arbeit war ebenfalls eine gesteigerte Genexpression von wichtigen endothelzellspezifischen Genen wie CD31 und vWF. Diese wurden im Vergleich zu den Genen von Zellen auf reinem PLA, das dort auch genutzt wurde, signifikant hochreguliert (93). Die hier untersuchten Zellen waren ausschließlich Endothelzellen, die es in vivo nicht so isoliert betreffen würde wie in dieser Untersuchung zur Genexpression. Daher ist auch die Auswirkung auf Osteoblasten, gerade aufgrund der möglichen Implantationen bei Frakturen relevant. Mehrfach wurden bereits positive Einflüsse von 3D-gedruckten PLA-BG-Gerüsten auf die Genexpression von Präosteoblastenzellen beschrieben und auf die verbesserten osteoinduktiven Eigenschaften des Bioglasses und der verstärkten osteogenen Differenzierung der Stammzellen hingewiesen (94, 95). Außerdem gibt es Berichte, in denen eine Wirkung auf Fibroblasten beschrieben wird. Day et al. berichtet von einer gesteigerten Genexpression des VEGF-Gens bei den Fibroblasten die dem Bioglas ausgesetzt waren (96). Auch Zhang et al. beschreibt eine Hochregulierung des KDRs durch das Bioglas bei HUVECs, die sich in Co-Kultur mit aus Urin gewonnenen Stammzellen befanden (97).

6.1.3 Matrigel®-Assay

In den Versuchen mit Matrigel® konnte durch Darstellung von gefäßähnlichen Strukturen die Effektivität durch das Bioglas auf die Differenzierung der HUVECs quantitativ aufgezeigt werden und bestätigte damit die Ergebnisse der Genexpression. Dieser Angiogenese Assay ist sehr aussagekräftig, da er in kurzer Zeit einfach durchzuführen und gut reproduzierbar ist (98, 99). Im Versuch mit dem Matrigel® ist die Differenzierung der Endothelzellen essenziell, da nur dann die Gefäßproliferationen ausgebildet werden können. In Abbildung 19 A sind die Ergebnisse der „nb. of junctions“ dargestellt, die deutlich zeigen, wie stark die Angiogenese bei den HUVECs ist, die dem PLA+20%BG ausgesetzt waren. Ähnlich wie beim Proliferationsassay ist auch hier ein Zusammenhang zwischen dem BG-Anteil und der Entwicklung der Zellen zu verzeichnen. Die Differenz ist allerdings noch stärker ausgeprägt, sowohl im Vergleich mit dem reinen PLA als auch mit den 5%- und 10%- Bioglas Modifikationen. Hier machen die verschiedenen Anteile des Bioglasses enorme Unterschiede aus, was anhand der Ergebnisse der qPCR nicht zu erwarten war. Das gleiche gilt auch für Abbildung 19 B, in der die „nb. of segments“ dargestellt sind und auch für die „total length“ in Abbildung 19 C. Die Gesamtlänge mit all ihren Ästen und Ausläufern spiegelt die Gesamtgröße der Gefäßformation wider und wäre in vivo für die Versorgung eines bestimmten Gebietes verantwortlich. Anhand der Ergebnisse ist davon auszugehen, dass durch das Bioglas ein erheblicher Vorteil für die Vaskularisierung des Operations- bzw. des Implantationsgebietes entstehen würde. Durch die verbesserte Gefäßsprossung und Durchblutung wird nicht nur die

Heilung gefördert, sondern auch die Unterversorgung und die Gefahr von Infektionen reduziert. Vor allem mit hohen prozentualen Anteilen an BG sind deutliche Vorteile durch dieses Material zu erwarten. Der Versuchsaufbau mit dem Matrigel® wie in dieser Arbeit, wurde bisher in anderen Studien nicht auf diese Art und Weise durchgeführt. In ähnlichen Versuchen wurden aber vergleichbar gute Ergebnisse erzielt. Im Gegensatz zu dem Medium, das in dieser Arbeit genutzt wurde, in dem ausschließlich die 3D-gedruckten Plättchen inkubierten, wurden in der Arbeit von Day et al. Fibroblasten mit dem Bioglas (45S5) inkubiert. Dadurch wurden nicht nur Stoffe aus dem Plättchen gelöst, sondern auch Wachstumsfaktoren (VEGF) der Fibroblasten ins Medium sezerniert. Das Medium wurde gesammelt und zu humanen Endothelzellen gegeben. Dort konnte eine signifikante Steigerung der Proliferation der Endothelzellen von 61,5% in 24 Stunden im Vergleich zum Kontrollmedium ohne Bioglas und Fibroblasten festgestellt werden. Die Fibroblasten im Medium ohne BG sezernierten deutlich weniger VEGF als in Kombination mit BG, was sich in den Ergebnissen der Proliferation widerspiegelte. Denn dort konnte eine nicht-signifikante Steigerung der Proliferation der Endothelzellen von 25,7% gemessen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass sich die Inkubation mit Bioglas positiv auf die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren auswirkt und zu einer verbesserten Proliferation, sowie Zunahme der Ausbildung von Gefäßstrukturen führt (96). Auch Zhang et al. berichtet über eine deutlich vermehrte Ausbildung kapillarähnlicher Netzwerke durch 45S5 Bioglas im Vergleich zum Kontrollmedium (97). In Bezug auf die Vaskularisierung konnten in vitro also schon mehrfach positive Effekte durch das Bioglas beobachtet werden, was die Ergebnisse unseres Versuchs bekräftigt.

6.1.4 Chorioallantoic-Membran-Assay

Der CAM-Assay ist ein einfaches und gut reproduzierbares Verfahren, das sehr gut zur Testung der Angiogenese geeignet ist und auch in anderen Studien zu diesem Zweck genutzt wurde (100, 101). Bisher gibt es wenige Studien, die sich mit dem Effekt durch das Bioglas in ovo beschäftigt haben. Es wurde aber bereits berichtet, dass die Einbettung von Silikonelastomeren, die mit Nano- und Mikropartikeln aus Bioglas versetzt waren, in die CAM durchaus gut funktioniert, die Vaskularisierung allerdings nicht verbessert wurde (102). In diesen Versuchen wurde aber mit einer Bioglaskonzentration von 5% gearbeitet, die wir aufgrund der deutlich geringeren Effekte im Vergleich zu 10%- und 20%-BG-Anteil nicht miteingeschlossen haben. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 20-22 zeigen im direkten Vergleich miteinander einige Unterschiede auf. Diese Unterschiede sind, ebenso wie bei den anderen Versuchen, auf das Bioglas zurückzuführen. Denn es ist zu erkennen, dass die Gefäßführung und Anordnung bei den Bioglas-Modifikationen anders verläuft als beim reinen PLA. Das Bioglas scheint die Angiogenese derart zu steigern, dass die Plättchen in den Abbildungen 21 und 22 geradewegs in die Gefäßkonstrukte eingebettet

werden. Zunächst verlaufen die weiter peripher liegenden Gefäße strikt auf das Plättchen zu und in unmittelbarer Nähe scheinen sich die Gefäße parallel an das Plättchen anzuheften. Im Gegensatz dazu wachsen die Gefäße beim reinen PLA lediglich unter dem Plättchen hindurch (Abb. 20), ohne in Bezug oder Kontakt zu diesem zu stehen. Die Vaskularisierung des Plättchens in Abb. 23 B ist ein Phänomen, das bei 3D-gedruckten Cages mit Poren, die in dieser Arbeit nicht verwendet wurden, interessant sein könnte. Dort ist zu erkennen, dass die Gefäßeinsprossung durchaus bis auf das Material reicht, was bei den anderen Plättchen durch die mangelnde Sicht hindurch nicht zu beurteilen war. Durch Poren in solchen Konstrukten könnte eine größere Oberfläche des Materials geboten und die Vaskularisierung verbessert werden, was sich in vivo positiv auf die Versorgung des umliegenden Gewebes auswirken könnte. Wie unter 2.1.4 beschrieben, ist der mechanische Druck auf den Knochen durch herkömmliche Osteosyntheseplatten kontraproduktiv für die Gefäßneubildung. Würde es die Stabilität zulassen, ein PLA-BG Konstrukt mit Poren nutzen zu können, ist durch die Ergebnisse in dieser Arbeit anzunehmen, dass die verbesserte Neovaskularisierung die Refrakturhäufigkeit, die durch Perren et al. (33) beschrieben wurde, reduzieren könnte. Allerdings konnte bei Konstrukten aus Bioglas und B-Tricalcium Phosphat bereits festgestellt werden, dass die Stabilität des Materials nicht für tragende Funktionen geeignet ist (103). Ob die Stabilität durch eine PLA+BG-Kombination gesteigert werden kann, muss zukünftig noch untersucht werden.

Anhand der Ergebnisse aus Abbildung 25 lässt sich davon ausgehen, dass die Gruppe des reinen PLAs keine Auswirkung auf die Vaskularisierung der CAM hat. Die Dichtezunahme nach 7 Tagen lag nur bei ca. 11%, was vermutlich das gleiche Resultat wie ohne das PLA-Plättchen gewesen wäre. In der Gruppe des PLA+10%BG ist bereits ein größerer Unterschied zu erkennen, allerdings ist dieser nicht signifikant. Auch hier zeigt sich bei steigendem Bioglas-Anteil ein deutlicher Unterschied und Vorteil. Denn beim PLA+20%BG ist die Dichtezunahme der Gefäße nach 7 Tagen so stark gestiegen, dass es einen hoch signifikanten Unterschied zur Gruppe des reinen PLAs und sogar zu der des PLA+10%BG gibt. Diese erhebliche positive Auswirkung auf die Vaskularisierung bestätigt noch einmal die Ergebnisse der anderen Versuche. Die Auswirkung auf die Endothelzellen ist somit eindeutig als positiv zu bewerten. Da in vivo aber auch andere Zelltypen durch das Material beeinflusst werden, ist auch die Wirkung auf diese Zellen von Bedeutung. Das Bioglas ist auch in dieser Hinsicht erforscht worden und zeigt osteostimulierende und osteokonduktive Eigenschaften (104). Die Proliferation von humanen Osteoblasten konnte durch Bioglas gesteigert werden und es wurde gezeigt, dass dafür u.a. die ionische Zusammensetzung verantwortlich ist (91, 105). Die Arbeitsgruppe von Prof. Henrich beschreibt in ihrer Arbeit durch Söhling et al. auch einen positiven Effekt auf mesenchymale Stammzellen (106). Dort wurde erstmals mit einer Bioglaskonzentration von 20% gearbeitet und es konnte, wie in unserer Arbeit, eine erhöhte

Bioaktivität festgestellt werden. Außerdem wird durch Handel et al. beschrieben, dass die MSCs positiv durch das Bioglas beeinflusst werden, denn in Versuchen zum CAM-Assay mit Kollagen beschichtetem Bioglas zeigte sich ein deutlich positiver Effekt auf die Vaskularisierung (107). Durch diese Versuche wurde nicht nur bewiesen, dass das Bioglas einen positiven Einfluss auf die Angiogenese hat, sondern es wurde auch die Biokompatibilität bestätigt, die bereits andere Gruppen durch ihre Versuche mit Bioglas-Kompositgerüsten zeigen konnten (108). Die bisher beschriebenen positiven Effekte, lassen sich u.a. auch auf die langsame und kontinuierliche Freisetzung der Bestandteile des BGs zurückführen. Eine zu schnelle Freisetzung kann zu zytotoxischen Effekten führen wie Fernandes et al. beschrieben hat (109). Die Kombination aus PLA+BG, vor allem mit einer BG-Konzentration von 20%, zeigen in unseren Versuchen sehr gute Ergebnisse bezüglich der Proliferation, Genexpression, Angiogenese und der Biokompatibilität in ovo und in vivo. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden die Forschungsergebnisse dieser Arbeit bereits veröffentlicht (110). In den folgenden Studien muss das Material in vivo weiter erforscht werden, um die Eigenschaften weiter zu spezifizieren. Es müssen die antibakteriellen Eigenschaften des BGs untersucht werden, die in retrospektiven Studien bisher als vielversprechend gewertet wurden (72). Ein wichtiger Punkt ist außerdem herauszufinden, wie es sich mit der Biodegradierbarkeit verhält. Der Abbau des Materials und folglich der zeitliche Verbleib in vivo sind wichtige Aspekte für den Einsatz als Implantatmaterial. Interessant dabei wird auch sein, wie sich der Abbau auf die Stabilität des Materials auswirkt. Im Vergleich zum reinen PLA wurde durch den Zusatz von Bioglas nicht nur eine verbesserte mechanische Festigkeit festgestellt, sondern auch ein verminderter Gewichtsverlust, was für einen langsameren Abbau des Materials spricht (92). Außerdem müssen die bisher verwendeten Modelle angepasst werden, um zu untersuchen, welchen Effekt eine veränderte Dicke und Porengröße des Materials hat.

6.2 Chitosan

In dieser Arbeit wurde Chitosan in verschiedensten Modifikationen und Konzentrationen genutzt, um zu erforschen, wie es sich in Kombination mit Polylactid auf humane Osteoblasten auswirkt. Da in bisherigen Studien von einem positiven Effekt des Chitosans auf Osteoblasten berichtet wurde, war es wichtig herauszufinden, wie es sich in den uns vorliegenden Kombinationen verhält.

6.2.1 Proliferationsassay

In diesem Assay konnte anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 26-27) zunächst festgestellt werden, dass es optisch keine signifikanten Unterschiede zu geben scheint. Die 1%-Modifikationen zeigen ein ähnliches Zellbild wie das reine PLA. Nur das PLA+4%CTK und PLA+10%CT scheinen deutlich weniger vitale Zellen vorzuweisen. Auch die quantitativen Ergebnisse in Abb. 28 zeigen insgesamt ähnliche Tendenzen, wobei Unterschiede zwischen den unterschiedlichen prozentualen Anteilen vorliegen. Vor allem bei den Zellen der 1%-Modifikationen ist in Abb. 28 zu erkennen, dass es von Tag 1 zu Tag 4 einen Wachstumsvorteil gegenüber den Zellen des reinen PLAs zu geben scheint. Lediglich die Gruppen des PLA+4%CTK und PLA+10%CT schneiden schlechter oder vergleichbar mit den Gruppen des reinen PLAs ab. Dass die Proliferationsrate an Tag 7 bei allen Präparaten zu sinken scheint, lässt sich am ehesten damit erklären, dass die Zunahme an Zellen von Tag 4 zu Tag 7 bei dem reinen PLA deutlich erhöht war, während das Zellwachstum bei den anderen Plättchen abgenommen hat. Dadurch nimmt die Differenz zu den Modifikationen ab und stellt sich wie gezeigt dar. Da die Ergebnisse im Proliferationsassay ähnlich zu denen der Bioglas-Versuche zu sein scheinen, kann auch hier zunächst ein Platzmangel als Grund für diese Annäherung der Zellzahl erahnt werden. Da die Plättchen aber deutlich größer sind als die des PLA+BG, ist es eher unwahrscheinlich, dass in der Kürze der Zeit, trotz initial erhöhter Zellzahl, die Plättchen bereits voll besiedelt waren. Eine andere Hypothese ist, dass sich aufgrund des Zellstoffwechsels und Interaktion mit dem Material die Oberfläche und Beschaffenheit derart verändert hat, dass sich dadurch die Bedingungen für die Proliferation der Zellen verändert und eventuell verschlechtert haben. Die Osteoblasten auf dem PLA+4%CTK bleiben in den Ergebnissen stets unterhalb der hOBs des reinen PLAs. Dieser Komplex hat folglich keinen positiven Effekt auf die hOBs und wurde deshalb nicht in die weiteren Versuche miteingeschlossen. Die Ergebnisse der Zellen der 1%-Modifikationen stellen sich in diesem Versuch ähnlich dar wie beim Bioglas, was die Erwartungen an die weiteren Versuche gesteigert hat.

6.2.2 qPCR

In der qPCR wurde die Expression spezifischer Gene der Osteoblasten untersucht, die wichtig für die Funktion der Zellen sind. Aus den Ergebnissen der qPCR können allerdings nur wenig positive Erkenntnisse gezogen werden, da die Genexpression der Zellen der meisten Derivate an beiden Tagen schlechter war als im Vergleich zu den Zellen des reinen PLAs. Die Zellen der Gruppe des PLA+10%CT erreichte noch das beste Outcome bei der Expression der Gene OPN und RUNX2 an Tag 4 (Abb. 29 B und 30 B). Da aber auch dort keine signifikanten Unterschiede gemessen wurden, ist die erhoffte positive Wirkung des Materials auf die Genexpression der humanen Osteoblasten in Frage zu stellen. In der Arbeit von Pitrolino et al. wurde beschrieben, dass Zellen auf reinem Chitosan eine geringere Stoffwechselaktivität und einen geringeren DNA-Gehalt im Vergleich zu Kontrollen und Kombinationsprodukten mit nano-hydroxyapatit aufwiesen (111). Das würde unsere Ergebnisse der qPCR plausibel erklären, da scheinbar kein Material in den Kombinationen dabei ist, was einen signifikant positiven Effekt auf die Osteoblasten hat. Aber es könnte auch die Hypothese aufgestellt werden, dass das Chitosan sogar einen negativen Effekt auf die Zellen hat, da die spezifische Entwicklung der Osteoblasten unter Einfluss des Chitosans und der Modifikationen verlangsamt bzw. gestört erscheint. Somit musste zunächst untersucht werden, ob eine zytotoxische Wirkung durch das Material vorliegt, was diese Ergebnisse der qPCR gegebenenfalls bestätigen würde.

6.2.3 Zytotoxizitätsassay

Nachdem die qPCR abgeschlossen und die Ergebnisse interpretiert wurden, haben wir ein Zytotoxizitätsassay mit Fibroblasten durchgeführt, um eine eventuelle Schädigung der Zellen durch das Chitosan auszuschließen. In den Ergebnissen zu diesem Versuch stellte sich heraus, dass die Unterschiede im Vergleich zum reinen PLA zu gering sind, als dass von einer Zytotoxizität berichtet werden könnte (Abb. 32). Nur beim PLA+10%CT könnte angenommen werden, dass eine leichte Zytotoxizität zur reinen PLA-Kontrolle vorliegt. Allerdings konnte auch dort kein statistisch signifikanter Unterschied gemessen werden. In der Arbeit von Dinescu et al. wird berichtet, dass reines Chitosan, was dort als Kontrolle diente, eine leicht höhere Zytotoxizität als Kombinationsgerüste aufwies (112). Insgesamt war die Zytotoxizität dort trotzdem sehr gering, sodass der Effekt auf die Zellen nur minimale Auswirkungen hatte, was zu den Ergebnissen in unserer Arbeit passen würde. Obwohl in vielen Studien der letzten Jahre bewiesen wurde, dass das Chitosan einen positiven Effekt auf die Proliferation der Osteoblasten hat und die Mineralisation der Knochenmatrix fördert (113), konnten wir diese Aussage in dem kurzen Untersuchungszeitraum von 7 Tagen nicht bestätigen. Anhand der Ergebnisse aus allen Versuchen, können wir dem Chitosan eine neutrale Wirkung auf die Zellen zusprechen. Diese Neutralität wurde auch durch Li et al. beschrieben, die zeigten, dass

das Chitosan in Kombination mit anderen Stoffen mehr Wirkung zeigt als alleine (76). Auch die Modifikationen, die wir zusätzlich genutzt haben, weisen keinen Vorteil gegenüber dem PLA+Chitosan oder dem reinen PLA auf. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die uns vorliegenden Materialien der Polylactid-Chitosan-Kombinationen biokompatibel sind. Es konnte zwar kein positiver Effekt auf die Markerexpression und die Proliferation von Osteoblasten durch das Material nachgewiesen werden, aber wenn in zukünftigen Versuchsreihen gegebenenfalls an den Kombinationen und prozentualen Anteilen Veränderungen vorgenommen werden, ist es nicht ausgeschlossen positive Effekte zu ermitteln. Da das Chitosan selbst, aufgrund seiner quellenden Eigenschaften, aber als mechanisch schwach und instabil gilt, sollten Kombinationen mit anderen Stoffen beibehalten werden und die Konzentrationen des Chitosans nicht zu hoch sein (113, 114). Eine andere Idee zur Verwendung des Chitosans wäre auch der Einsatz als Trägermaterial. Es wurde in dieser Funktion bereits für verschiedenste Ansprüche getestet. Sivashankari et al. beschreiben die Möglichkeit, das Chitosan mit spezifischen Wachstumsfaktoren für die Regeneration von Knochen-, Knorpel- und Nervengewebe, für Hautdefekte und Wundheilungsstörungen zu nutzen (115).

6.3 Fehlerdiskussion

Eine in vitro Studie unterliegt immer einigen Limitationen. Zellen sind in vivo komplexen Reaktionen und Vorgängen des umliegenden Gewebes ausgesetzt. Diese können in einer in vitro Studie wie wir sie durchgeführt haben, nicht nachgestellt werden. Stressreaktionen, Hormonausschüttung, Zell-Zell-Interaktion verschiedener Zelltypen, unterschiedlich gute und schlechte Bedingungen und Voraussetzungen, die in vivo vorherrschen, werden bei in vitro Studien vermieden. Andernfalls kann das primäre Ziel, eine möglichst konkrete Aussage durch genaue Ergebnisse zu treffen, nicht erreicht werden. Somit können zwar Aussagen unter guten Bedingungen über das Material und die Zellen getätigt werden, aber diese sind nicht direkt auf in vivo Experimente übertragbar. Außerdem sind die Ergebnisse, die wir aus dieser Studie gewonnen haben, nur kurzfristige Aussagen, denn die Versuche waren auf wenige Tage begrenzt. Es konnten also keine Erkenntnisse über das Langzeitverhalten des Materials und der Zellen gewonnen werden. Durch das sorgfältige und gewissenhafte Arbeiten im Labor unter guten Voraussetzungen und mehrfacher Wiederholung der Versuche sind Fehler in der Versuchsdurchführung sehr unwahrscheinlich. Etwaige Fehler können durch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in anderen Versuchsreihen minimiert werden. Ein Problem bei in vitro Studien wie dieser könnte gegebenenfalls auch ein Platzmangel auf den 3D-gedruckten Plättchen sein, was zur Verfälschung der Proliferationsraten geführt haben könnte. Außerdem ist es möglich, dass die Materialzusammensetzung, sowohl beim Bioglas, als auch

beim Chitosan, nicht konstant gleich war, sodass in den Messungen der verschiedenen Versuche teilweise unterschiedliche Tendenzen ersichtlich waren. Unabhängig vom untersuchten Material selbst, ist es möglich, dass Produkte aus den Versuchen, wie z.B. die Primer der verschiedenen Gene, unterschiedlich gut funktionierten, sodass es da zu Abweichungen in den Ergebnissen gekommen sein könnte. In Bezug auf den CAM-Assay kann die Vermutung angestellt werden, dass nicht jedes der Hühnereier gleich günstige qualitative Bedingungen aufwies, weshalb aber auch mehrere Versuchsreihen durchgeführt wurden, um diese Fehlerquelle zu minimieren. Es kann auch sein, dass bei der Präparation der Eier unterschiedlich starker Stress auf die Embryonen und die CAM wirkte, sodass die nachfolgende Entwicklung beeinträchtigt gewesen sein könnte.

Abschließend kann aber gesagt werden, dass die Anzahl („n“) der Versuchsreihen in dieser Arbeit und allen Versuchen groß genug war, um mögliche Fehler weitestgehend zu minimieren.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Die operative Frakturversorgung mittels Osteosyntheseverfahren ist heutzutage Standard in vielen Kliniken. Die Entfernung des Materials ist mühsam und immer wieder mit Komplikationen behaftet. Die Erforschung eines alternativen Materials zur Vermeidung eines zusätzlichen Eingriffs war die Grundlage dieser Forschungsarbeit. Das Tissue Engineering ist eine Methode zur Herstellung neuester Kombinationen verschiedener Materialien, die als Forschungsgrundlage in vielen Bereichen dienen. Diese Materialien können nicht nur zur mechanischen Stabilisierung der knöchernen Strukturen dienen, sondern auch durch die verschiedenen Eigenschaften zur positiven Zellentwicklung beitragen. So ist z.B. die Auswirkung auf die Wundheilung von Interesse, die durch eine positive angiogene Wirkung des Materials auf die Zellen gefördert werden kann.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass 3D-gedrucktes Verbundmaterial aus PLA und Bioglas eine vielversprechende Kombination für das Tissue Engineering ist. So konnte bei den Versuchen zur Proliferation ein deutlicher Vorteil durch das Bioglas in Bezug auf die Endothelzellen festgestellt werden. Dabei ist zu erwähnen, dass der prozentuale Anteil an Bioglas im Kompositmaterial eine entscheidende Rolle spielt, denn je höher der Anteil, desto schneller proliferierten die Zellen im Vergleich zur Kontrolle mit reinem PLA. Ebenso spiegelte sich das bei der qPCR wider. Auch dort hatten die Zellen, ausgesät auf den Bioglas-Modifikationen, eine signifikant höhere Genexpression von endothelzellspezifischen Genen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit reinem PLA. Nur zwischen den auf den BG-Modifikationen ausgesäten HUVECs selbst konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Über den zeitlichen Verlauf von Tag 1 zu Tag 4 hatte sich die Wirkung des BG auf die Genexpression positiv ausgewirkt, in dem die Differenz zu den Kontrollen zugenommen hat. In den Versuchen mit dem Matrigel® und dem CAM-Assay konnte eine hochregulierte Angiogenese durch das Bioglas aufgezeigt werden. Im Matrigel® Experiment wurden statistisch signifikante Unterschiede in der Angiogenese der Endothelzellen zwischen den Gruppen des PLA+20%BG und der Gruppe des reinen PLAs als Kontrolle festgestellt. Der CAM-Assay konnte in ovo zeigen, dass die Angiogenese durch das PLA+20%BG deutlich gesteigert werden konnte. Es gab nicht nur signifikante Unterschiede zum reinen PLA, sondern sogar auch zum PLA+10%BG, sodass erneut eine Korrelation zwischen der Angiogenese und dem prozentualen Anteil an Bioglas gezeigt wurde. Damit ist der Einfluss des BG auf die Endothelzellen, einer der wichtigsten Faktoren der Wundheilung, insgesamt als sehr positiv zu werten. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein 3D-gedrucktes, biokompatibles, mechanisch stabiles und angiogenes Material aus PLA+BG hergestellt wurde, welches ein vielversprechendes Produkt für das Tissue Engineering und speziell dem Knochenersatz darstellt. Anknüpfend an diese Arbeit müssen in-vivo-Experimente durchgeführt werden, um

die bisherigen Ergebnisse zu verifizieren. Zukünftig muss das Material auch in Hinblick auf die Abbaubarkeit und die antibakterielle Wirkung untersucht werden. Ein Material, das angiogene, osteogene und antibakterielle Eigenschaften hat und dazu noch die nötige Stabilität und zeitversetzte Abbaubarkeit aufweist, würde stark zur Problemlösung der aktuellen Implantatchirurgie beitragen.

In der bisherigen Literatur wurden unterschiedliche Ergebnisse zum Chitosan geschildert. Die berichteten positiven Eigenschaften auf die Proliferation von Osteoblasten konnten wir in unseren Versuchen nicht bestätigen. Es zeigten sich zwar kleine Unterschiede zu den Osteoblasten der Kontrolle mit reinem PLA, allerdings waren diese nicht signifikant. Ebenso konnte eine Zytotoxizität des Chitosans, die anhand der Ergebnisse der qPCR vermutet wurde, ausgeschlossen werden. Es zeigte sich insgesamt also eine neutrale Wirkung des Chitosans in Bezug auf die Proliferation und die Genexpression von Osteoblasten. Dennoch ist die Biokompatibilität, die damit bewiesen wurde, als positives Ergebnis zu werten.

Zukünftig könnte die Kombination mit anderen Materialien variiert und die Höhe der Chitosankonzentration geändert werden, um in erneuten Experimenten andere Ergebnisse zu erzielen. Außerdem könnte erforscht werden, ob das Chitosan mit seiner neutralen Wirkung als Trägermaterial für Stoffe wie z.B. Wachstumsfaktoren geeignet ist, so wie es in anderen Arbeiten bereits beschrieben wurde. Damit könnte die Forschung zur Knochen- und Wundheilung mit Hilfe des Tissue Engineering vorangebracht werden.

8 Literaturverzeichnis

1. Rupp MW, Nike; Pfeifer, Christian, Lang, Siegmund; Kerschbaum, Maximilian; Krusch, Werner; Baumann, Florian; Alt, Volker. Inzidenz von Frakturen in der Erwachsenenpopulation in Deutschland - Eine Analyse von 2009 bis 2019. Zitiert am 19.08.2022: Deutsches Ärzteblatt 2021.
2. Unger RE, Halstenberg S, Günther H, Sartoris A, Brochhausen C, Kirkpatrick CJ. Bewertung von neuartigen Biomaterialien zum Zweck der Knochenrekonstruktion und -regeneration. *Der Orthopäde*. 2009;38(11):1020-8.
3. Peter Biberthaler MvG. Knochendefekte und Pseudarthrosen. Zitiert am 21.08.2022.2017.
4. Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*. 2005;105(7):2631-9.
5. Natalie Sims RB. Bone Cells and Their Function. Zitiert am 11.09.2022.2000.
6. Voggenreiter G. Knochenheilung. *Perioperative Medizin*. 2009;1(2):86-95.
7. Sckell A, Mittlmeier T. Grundkonzepte der operativen Frakturbehandlung. *Der Radiologe*. 2020;60(6):514-22.
8. Yamagiwa H, Endo N. [Bone fracture and the healing mechanisms. Histological aspect of fracture healing. Primary and secondary healing]. *Clin Calcium*. 2009;19(5):627-33.
9. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth Factor Regulation of Fracture Repair. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1999;14(11):1805-15.
10. Bailón-Plaza A, van der Meulen MC. A mathematical framework to study the effects of growth factor influences on fracture healing. *J Theor Biol*. 2001;212(2):191-209.
11. Bartl R. Lokalisation und Behandlung osteoporotischer Frakturen. In: Bartl R, editor. *Osteoporose in der Praxis: Vorsorge, Diagnostik und Therapie – evidence based*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2022. p. 167-84.
12. Vortkamp A, Pathi S, Peretti GM, Caruso EM, Zaleske DJ, Tabin CJ. Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. *Mechanisms of Development*. 1998;71(1):65-76.
13. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2008;19(5):459-66.
14. Hofmann A, Mattyasovszky SG, Brüning C, Ritz U, Mehling I, Meurer A, et al. Osteoblasten. *Der Orthopäde*. 2009;38(11):1009.
15. Kübler NR. Osteoinduktion und- reparation. *Oral and Maxillofacial Surgery*. 1997;1(1):2-25.
16. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(6937):337-42.

17. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The Osteoblast: A Sophisticated Fibroblast under Central Surveillance. *Science*. 2000;289(5484):1501-4.
18. Chen J, Singh K, Mukherjee BB, Sodek J. Developmental Expression of Osteopontin (OPN) mRNA in Rat Tissues: Evidence for a Role for OPN in Bone Formation and Resorption. *Matrix*. 1993;13(2):113-23.
19. Subraman V, Thiagarajan M, Malathi N, Rajan ST. OPN -Revisited. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(6):Ze10-3.
20. Komori T, editor Regulation of Osteoblast Differentiation by Runx2. *Osteoimmunology*; 2010 2010//; Boston, MA: Springer US.
21. Motamed K. SPARC (osteonectin/BM-40). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1999;31(12):1363-6.
22. Kroll J, Waltenberger J. Regulation der Endothelfunktion und der Angiogenese durch den Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktor-A (VEGF-A). *Zeitschrift für Kardiologie*. 2000;89(3):206-18.
23. Pries AR, Kuebler WM. Normal Endothelium. In: Moncada S, Higgs A, editors. *The Vascular Endothelium I*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2006. p. 1-40.
24. Steffel J, Lüscher TF. Endothelzellen. In: Pötzsch B, Madlener K, editors. *Hämostaseologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. p. 97-104.
25. Vestweber D. Endothelzellen: Barriere zwischen Blut und Gewebe. Zitiert am 14.09.20222004.
26. Ralf Brandes FL, Robert F. Schmidt. *Physiologie des Menschen - mit Pathophysiologie*; S. 298-300; Zitiert am 14.09.20222019.
27. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995;11:73-91.
28. Flamme I, Breier G, Risau W. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. *Dev Biol*. 1995;169(2):699-712.
29. D'Amore PA, Thompson RW. Mechanisms of angiogenesis. *Annu Rev Physiol*. 1987;49:453-64.
30. Carmeliet P, Collen D. Molecular analysis of blood vessel formation and disease. *Am J Physiol*. 1997;273(5):H2091-104.
31. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386(6626):671-4.
32. Kalka C, Asahara T, Krone W, Isner JM. Angiogenese und Vaskulogenese Therapeutische Strategien zur Stimulation der postnatalen Neovaskularisation. *Herz*. 2000;25(6):611-22.
33. Perren SM, Cordey J, Rahn BA, Gautier E, Schneider E. Early temporary porosis of bone induced by internal fixation implants. A reaction to necrosis, not to stress protection? *Clin Orthop Relat Res*. 1988(232):139-51.

34. Baldwin HS, Shen HM, Yan HC, DeLisser HM, Chung A, Mickanin C, et al. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development. *Development*. 1994;120(9):2539-53.
35. Blann A. von Willebrand factor and the endothelium in vascular disease. *Br J Biomed Sci*. 1993;50(2):125-34.
36. Mannucci PM. von Willebrand Factor: A Marker of Endothelial Damage?. zuletzt aktualisiert: September 1998. Zitiert am 24.08.2022 1998.
37. Ivy SP, Wick JY, Kaufman BM. An overview of small-molecule inhibitors of VEGFR signaling. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2009;6(10):569-79.
38. Michalke AAKK. Biomaterialien und Oberflächenbeschichtungen von Implantaten zur Verbesserung der Implantat-Knochen-Interaktion. Zitiert am 11.09.2022 2015.
39. Thomas P, Schuh A, Ring J, Thomsen M. Orthopädisch-chirurgische Implantate und Allergien. *Der Orthopäde*. 2008;37(1):75-88.
40. Effenberger H, Graf R, May M, Lojpur M, Imhof M, Lintner F. Anatomically adapted, HA coated SBG stem – Ten years of successful implantation / Anatomisch adaptierte, HA beschichtete SBG Prothese – 10 Jahre erfolgreiche Anwendung. 2004;49(10):290-4.
41. Trampuz A, Perka C, Borens O. Gelenkprotheseninfektion: Neue Entwicklungen in der Diagnostik und Therapie. *dmw*. 2013;138(31/32):1571-3.
42. Borens O, Helmy N. Infizierte Osteosynthese. *Der Chirurg*. 2016;87(10):822-30.
43. Mendel T, Goehre F, Hofmann GO. Perimplantäre Frakturen – assoziiert mit Plattenosteosynthese. *Trauma und Berufskrankheit*. 2014;16(4):323-9.
44. (Destatis) SB. Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) Operationen und Prozeduren der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern (4-Steller). Letzte Aktualisierung 22.09.2021. Zitiert am 19.08.2022 2021.
45. Vos D, Hanson B, Verhofstad M. Implant removal of osteosynthesis: the Dutch practice. Results of a survey. *J Trauma Manag Outcomes*. 2012;6(1):6.
46. Schildhauer TA. Metallentfernungen. *Trauma und Berufskrankheit*. 2007;9(3):S292-S6.
47. Williams BR, McCreary DL, Parikh HR, Albersheim MS, Cunningham BP. Improvement in Functional Outcomes After Elective Symptomatic Orthopaedic Implant Removal. *J Am Acad Orthop Surg Glob Res Rev*. 2020;4(9):e20.00137.
48. Lutz H, Peter K. 89. Das Risiko der Anaesthesie unter operativen Bedingungen. *Langenbecks Archiv für Chirurgie*. 1973;334(1):671-9.
49. KG GTV. OP-Management up2date - Geringeres Komplikationsrisiko durch spezifische Anästhesie-Erfahrung? Zitiert am 18.09.2022 2021.

50. Matsuura Y, Suzuki T, Akasaka T, Kanazuka A, Ozawa Y, Shiko Y, et al. Recovery of Forearm Bone Strength After Plate Removal: A Finite Element Analysis Study. *The Journal of Hand Surgery*. 2022.
51. Onche, II, Osagie OE, S IN. Removal of orthopaedic implants: indications, outcome and economic implications. *J West Afr Coll Surg*. 2011;1(1):101-12.
52. Health Nlo. Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Zitiert am 20.08.2022.
53. Black CRM, Goriainov V, Gibbs D, Kanczler J, Tare RS, Oreffo ROC. Bone Tissue Engineering. *Current Molecular Biology Reports*. 2015;1(3):132-40.
54. Saini G, Segaran N, Mayer JL, Saini A, Albadawi H, Oklu R. Applications of 3D Bioprinting in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10(21):4966.
55. Caddeo S, Boffito M, Sartori S. Tissue Engineering Approaches in the Design of Healthy and Pathological In Vitro Tissue Models. *Front Bioeng Biotechnol*. 2017;5:40.
56. Carrow JK, Kerativitayanan P, Jaiswal MK, Lokhande G, Gaharwar AK. Chapter 13 - Polymers for Bioprinting. In: Atala A, Yoo JJ, editors. *Essentials of 3D Biofabrication and Translation*. Boston: Academic Press; 2015. p. 229-48.
57. Lopes MS, Jardim AL, Filho RM. Poly (Lactic Acid) Production for Tissue Engineering Applications. *Procedia Engineering*. 2012;42:1402-13.
58. Duan X, Wang B, Yang L, Kadakia AR. Applications of 3D Printing Technology in Orthopedic Treatment. *Biomed Res Int*. 2021;2021:9892456.
59. Mitsouras D, Liacouras P, Imanzadeh A, Giannopoulos AA, Cai T, Kumamaru KK, et al. Medical 3D Printing for the Radiologist. *Radiographics*. 2015;35(7):1965-88.
60. Michalski MH, Ross JS. The shape of things to come: 3D printing in medicine. *Jama*. 2014;312(21):2213-4.
61. Murphy SV, De Coppi P, Atala A. Opportunities and challenges of translational 3D bioprinting. *Nature Biomedical Engineering*. 2020;4(4):370-80.
62. Santiago GF, Wolff A, Belzberg M, Gordon CR. Letter to the Editor. 3D-printed polymethylmethacrylate implant for cranioplasty. *Journal of Neurosurgery JNS*. 2019;130(5):1773-5.
63. Burn MB, Ta A, Gogola GR. Three-Dimensional Printing of Prosthetic Hands for Children. *J Hand Surg Am*. 2016;41(5):e103-9.
64. Simha Martynková G, Slíva A, Kratošová G, Čech Barabaszová K, Študentová S, Klusák J, et al. Polyamide 12 Materials Study of Morpho-Structural Changes during Laser Sintering of 3D Printing. *Polymers (Basel)*. 2021;13(5).
65. Shuang F, Hu W, Shao Y, Li H, Zou H. Treatment of Intercondylar Humeral Fractures With 3D-Printed Osteosynthesis Plates. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(3):e2461.

66. Cheng Y, Deng S, Chen P, Ruan R. Polylactic acid (PLA) synthesis and modifications: a review. *Frontiers of Chemistry in China*. 2009;4(3):259-64.
67. Romero-Araya P, Pino V, Nenen A, Cárdenas V, Pavicic F, Ehrenfeld P, et al. Combining Materials Obtained by 3D-Printing and Electrospinning from Commercial Polylactide Filament to Produce Biocompatible Composites. *Polymers (Basel)*. 2021;13(21).
68. Rütter H, Seif Amir Hosseini A, Frosch S, Hoffmann D, Lotz J, Lehmann W, et al. Refixation von osteochondralen Fragmenten mit resorbierbaren Polylactid-Implantaten. *Der Unfallchirurg*. 2020;123(10):797-806.
69. Prokop A, Jubel A, Helling HJ, Udomkaewkanjana C, Brochhagen HG, Rehm KE. Neue biodegradable Polylactid-implantate (Polypin®-C) zur Therapie von Radiuskopffrakturen. *Der Chirurg*. 2002;73(10):997-1004.
70. Baino F, Hamzehlou S, Kargozar S. Bioactive Glasses: Where Are We and Where Are We Going? *J Funct Biomater*. 2018;9(1).
71. Schätzlein EKCSNRUNJHDFJMIBADPPLABSwCCR, Engineering MSCAfBT. 3D-Printed PLA-Bioglass Scaffolds with Controllable Calcium Release and MSC Adhesion for Bone Tissue Engineering. *Polymers [Internet]*. 2022; 14(12).
72. Malat TA, Glombitza M, Dahmen J, Hax PM, Steinhausen E. The Use of Bioactive Glass S53P4 as Bone Graft Substitute in the Treatment of Chronic Osteomyelitis and Infected Non-Unions - a Retrospective Study of 50 Patients. *Z Orthop Unfall*. 2018;156(2):152-9.
73. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 2006;31(7):603-32.
74. Roberts GAF. Structure of Chitin and Chitosan. In: Roberts GAF, editor. *Chitin Chemistry*. London: Macmillan Education UK; 1992. p. 1-53.
75. Miwa A, Ishibe A, Nakano M, Yamahira T, Itai S, Jinno S, et al. Development of Novel Chitosan Derivatives as Micellar Carriers of Taxol. *Pharmaceutical Research*. 1998;15(12):1844-50.
76. Li Z, Ramay HR, Hauch KD, Xiao D, Zhang M. Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2005;26(18):3919-28.
77. Wang L, Khor E, Wee A, Lim LY. Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: Assessment of incisional wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002;63(5):610-8.
78. Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C, Zou X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*. 2004;339(16):2693-700.
79. Khatkhat S, Wahid F, Liu LP, Jia SR, Chu LQ, Xie YY, et al. Applications of cellulose and chitin/chitosan derivatives and composites as antibacterial materials: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103(5):1989-2006.

80. Hofmann A, Ritz U, Verrier S, Eglin D, Alini M, Fuchs S, et al. The effect of human osteoblasts on proliferation and neo-vessel formation of human umbilical vein endothelial cells in a long-term 3D co-culture on polyurethane scaffolds. *Biomaterials*. 2008;29(31):4217-26.
81. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 2005;21(3):389-95.
82. Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Seminars in Cancer Biology*. 2005;15(5):378-86.
83. Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA. Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *PROTEOMICS*. 2010;10(9):1886-90.
84. Merckx G, Tay H, Lo Monaco M, van Zandvoort M, De Spiegelaere W, Lambrechts I, et al. Chorioallantoic Membrane Assay as Model for Angiogenesis in Tissue Engineering: Focus on Stem Cells. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2020;26(6):519-39.
85. Wiesmann N, Mendler S, Buhr CR, Ritz U, Kämmerer PW, Brieger J. Zinc Oxide Nanoparticles Exhibit Favorable Properties to Promote Tissue Integration of Biomaterials. *Biomedicines*. 2021;9(10).
86. Wijeratne A. The Delta-Delta Ct Method 2017.
87. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013;3(3):71-85.
88. Gregor A, Filová E, Novák M, Kronek J, Chlup H, Buzgo M, et al. Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. *Journal of Biological Engineering*. 2017;11(1):31.
89. Tyler B, Gullotti D, Mangraviti A, Utsuki T, Brem H. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;107:163-75.
90. Bodnárová S, Gromošová S, Hudák R, Rosocha J, Živčák J, Plšíková J, et al. 3D printed Polylactid Acid based porous scaffold for bone tissue engineering: an in vitro study. *Acta Bioeng Biomech*. 2019;21(4):101-10.
91. Deb S, Mandegaran R, Di Silvio L. A porous scaffold for bone tissue engineering/45S5 Bioglass® derived porous scaffolds for co-culturing osteoblasts and endothelial cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2010;21(3):893-905.
92. Barbeck M, Serra T, Booms P, Stojanovic S, Najman S, Engel E, et al. Analysis of the in vitro degradation and the in vivo tissue response to bi-layered 3D-printed scaffolds combining PLA and biphasic PLA/bioglass components – Guidance of the inflammatory response as basis for osteochondral regeneration. *Bioactive Materials*. 2017;2(4):208-23.

93. Aguirre Aea. Control of microenvironmental cues with a smart biomaterial composite promotes endothelial progenitor cell angiogenesis. "European cells and materials". Zitiert am 20.11.20222012.
94. Distler T, Fournier N, Grünewald A, Polley C, Seitz H, Detsch R, et al. Polymer-Bioactive Glass Composite Filaments for 3D Scaffold Manufacturing by Fused Deposition Modeling: Fabrication and Characterization. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:552.
95. Alksne M, Kalvaityte M, Simoliunas E, Rinkunaite I, Gendviliene I, Locs J, et al. In vitro comparison of 3D printed polylactic acid/hydroxyapatite and polylactic acid/bioglass composite scaffolds: Insights into materials for bone regeneration. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2020;104:103641.
96. Day RM. Bioactive Glass Stimulates the Secretion of Angiogenic Growth Factors and Angiogenesis in Vitro. *Tissue Engineering.* 2005;11(5-6):768-77.
97. Zhang Y, Niu X, Dong X, Wang Y, Li H. Bioglass enhanced wound healing ability of urine-derived stem cells through promoting paracrine effects between stem cells and recipient cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* 2018;12(3):e1609-e22.
98. Carpentier G, Berndt S, Ferratge S, Rasband W, Cuendet M, Uzan G, et al. Angiogenesis Analyzer for ImageJ - A comparative morphometric analysis of "Endothelial Tube Formation Assay" and "Fibrin Bead Assay". *Sci Rep.* 2020;10(1):11568.
99. Ponce ML. Tube Formation: an In Vitro Matrigel Angiogenesis Assay. In: Murray C, Martin S, editors. *Angiogenesis Protocols: Second Edition.* Totowa, NJ: Humana Press; 2009. p. 183-8.
100. Fischer D, Fluegen G, Garcia P, Ghaffari-Tabrizi-Wizsy N, Gribaldo L, Huang RY, et al. The CAM Model—Q&A with Experts. *Cancers [Internet].* 2023; 15(1).
101. Moreno-Jiménez I, Kanczler JM, Hulsart-Billstrom G, Inglis S, Oreffo ROC. The Chorioallantoic Membrane Assay for Biomaterial Testing in Tissue Engineering: A Short-Term In Vivo Preclinical Model. *Tissue Engineering Part C: Methods.* 2017;23(12):938-52.
102. Cohrs NH, Schulz-Schönhagen K, Mohn D, Wolint P, Meier Bürgisser G, Stark WJ, et al. Modification of silicone elastomers with Bioglass 45S5® increases in ovo tissue biointegration. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials.* 2019;107(4):1180-8.
103. Seidenstuecker M, Kerr L, Bernstein A, Mayr HO, Suedkamp NP, Gadow R, et al. 3D Powder Printed Bioglass and β -Tricalcium Phosphate Bone Scaffolds. *Materials [Internet].* 2018; 11(1).
104. Hu Y-c, Zhong J-p. Osteostimulation of bioglass. *Chinese Medical Journal.* 2009;122(19).

105. Sun J-Y, Yang Y-S, Zhong J, Greenspan DC. The effect of the ionic products of Bioglass® dissolution on human osteoblasts growth cycle in vitro. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2007;1(4):281-6.
106. Söhling N, Al Zoghool S, Schätzlein E, Neijhoft J, Oliveira KMC, Leppik L, et al. In vitro Evaluation of a 20% Bioglass-Containing 3D printable PLA Composite for Bone Tissue Engineering. *Int J Bioprint*. 2022;8(4):602.
107. Handel M, Hammer TR, Nooeaid P, Boccaccini AR, Hoefler D. 45S5-Bioglass®-Based 3D-Scaffolds Seeded with Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells Induce In Vivo Vascularization in the CAM Angiogenesis Assay: Mary Ann Liebert, Inc., publishers; 2013 2013/12/01. 2703-12 p.
108. Vargas GE, Mesones RV, Bretcanu O, López JMP, Boccaccini AR, Gorustovich A. Biocompatibility and bone mineralization potential of 45S5 Bioglass®-derived glass–ceramic scaffolds in chick embryos. *Acta Biomaterialia*. 2009;5(1):374-80.
109. Fernandes HR, Gaddam A, Rebelo A, Brazete D, Stan GE, Ferreira JMF. Bioactive Glasses and Glass-Ceramics for Healthcare Applications in Bone Regeneration and Tissue Engineering. *Materials [Internet]*. 2018; 11(12).
110. Cichos S, Schätzlein E, Wiesmann-Imilowski N, Blaeser A, Henrich D, Frank J, et al. A new 3D-printed polylactic acid-bioglass composite for bone tissue engineering induces angiogenesis in vitro and in ovo. *Int J Bioprint*. 2023;9(5):751.
111. Pitrolino KA, Felfel RM, Pellizzeri LM, Mlaren J, Popov AA, Sottile V, et al. Development and in vitro assessment of a bi-layered chitosan-nano-hydroxyapatite osteochondral scaffold. *Carbohydrate Polymers*. 2022;282:119126.
112. Dinescu S, Ionita M, Pandele AM, Galateanu B, Iovu H, Ardelean A, et al. In vitro cytocompatibility evaluation of chitosan/graphene oxide 3D scaffold composites designed for bone tissue engineering. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 2014;24:2249-56.
113. Levengood SKL, Zhang M. Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*. 2014;2(21):3161-84.
114. Shanmugasundaram N, Ravichandran P, Neelakanta Reddy P, Ramamurty N, Pal S, Panduranga Rao K. Collagen–chitosan polymeric scaffolds for the in vitro culture of human epidermoid carcinoma cells. *Biomaterials*. 2001;22(14):1943-51.
115. Sivashankari PR, Prabakaran M. Prospects of chitosan-based scaffolds for growth factor release in tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016;93:1382-9.

9 Materialienliste

9.1 Gerätschaften

Produkte	Hersteller, Adresse
Wärmebank /Heizplatte Typ 13800	MEDAX Nagel GmbH Kiel, Germany
Lichtmikroskop Wilovert 30 Labormikroskop Seriennummer: 202888	Helmut Hund GmbH Wetzlar, Germany
EVOS fl -Fluoreszenzmikroskop Seriennummer: C0913-153F-010	Advanced Microscopy Group (AMG) USA
Zellkulturbank Safe 2020 1.8	Thermo Electron LED GmbH Germany
Eppendorf Zentrifuge 5804 R	Eppendorf SE Hamburg, Germany
Heraeus Fresco™ 17 Zentrifuge	Thermo Scientific™ Germany
Luna™ Automated Cell Counter	Logos Biosystems Korea
Reverse Transkription peqSTAR 2X Gradient	VWR peqlab Darmstadt, Germany
Photometer – NanoDrop OneC	Thermo Scientific™ Germany
Eppendorf Research® Pipette 10µl 100µl 1000µl	Eppendorf SE Hamburg, Germany
Glomax® Photometer	Promega Germany
ErgoOne® Single Channel Pipette	Starlab Group Germany
qTower ³ G qPCR-Thermocycler	Analytik Jena AG Jena, Germany
HERAcell 240 Inkubator	Heraeus Hanau, Germany
Accu-jet® pro Pipettierhelfer	Brand GmbH + Co KG Wertheim, DE

9.2 Software

Software	Hersteller, Adresse
ImageJ®	ImageJ® Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, https://imagej.nih.gov/ij/index.html
Microsoft® Office 365, Word, Powerpoint, Excell	Microsoft® Cooperation, USA
Microsoft® Office 365, Word, Powerpoint, Word	Microsoft® Cooperation, USA
qPCRsoft Software	Analytik Jena AG Jena, Germany
GraphPad Prism 9.1.1	GraphPad Software San Diego, CA 92108, USA

9.3 Instrumente

Software	Hersteller, Adresse
Anatomische Pinzette	Anatomische Pinzette, Aesculap AG & Co. KG Tuttlingen, Germany

9.4 Reagenzien

Reagenz	Hersteller, Adresse
Human umbilical vein endothelial cells	PromoCell® Sickingenstr. 63/65 69126 Heidelberg, Germany
L-929 Fibroblasten	ATCC® Wesel, Germany
Fetales Kälber Serum (FCS)	Biochrom AG Germany
Penicillin-Streptomycin Solution Hybri-Max™	SIGMA-ALDRICH 3050 Spruce Street, St. Louis MO 63103 USA

EBM-2® Endothelial Cell Basal Medium-2 Zusätze: EGM-2™ SingleQuots® + 10% FCS + 1% PS	Lonza Walkersville, MD USA
PBS - Dulbeccos Phosphate Buffered Saline	Siga-Aldrich® 3050 Spruce Street, St. Louis MO 63103 USA
Osteoblasten-Medium: DMEM/F-12 (1:1) + GlutaMAX™ + 10% FCS + 1% PS	Gibco USA
Fibroblasten (L929) - Medium: DMEM (1X) + 10% FCS + 1% PS	Gibco USA
Accutase® solution	Siga-Aldrich® 3050 Spruce Street, St. Louis MO 63103 USA
Resazurin alamarBlue™ Cell Viability Reagent	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific USA
RNase-free Water	QIAGEN Hilden, Germany
Blue Sybr. Green qPCR 2x Mix	Biozym Germany
Random Primers	Promega Madison, WI, USA
10X M-MuLV Reverse Transkriptase Puffer	New England BioLabs Inc. Germany
10X M-MuLV Reverse Transkriptase	New England BioLabs Inc. Germany
10mM dNTP Mix	Thermo Scientific Waltham USA
hs GAPDH FW; Sequenz: CGA CCA CTT TGT CAA GCT CA	Eurofins Genomics Germany
hs GAPDH RV; Sequenz:	Eurofins Genomics

AGG GGA GAT TCA TGT TGG TG	Germany
hs CD31 (PECAM-1) FW; Sequenz: CAT TGG CGT GTT GGG AAG AA	Eurofins Genomics Germany
hs CD31 (PECAM-1) RV; Sequenz: GCT CAT GTT TGC CTA GCT CC	Eurofins Genomics Germany
hs KDR FW; Sequenz: TTA CTT GCA GGG GAC AGA GG	Eurofins Genomics Germany
hs KDR RV; Sequenz: TTC CCG GTA GAA GCA CTT GT	Eurofins Genomics Germany
hs vWF FW; Sequenz: GGA TTC AGT GGA TGC AGC AG	Eurofins Genomics Germany
hs vWF RV; Sequenz: TAG GGA GGT CTT CGA TTC GC	Eurofins Genomics Germany
hs OPN FW; Sequenz: GGT CAC TGA TTT TCC CAC GG	Eurofins Genomics Germany
hs OPN RV; Sequenz: CTC CTC GCT TTC CAT GTG TG	Eurofins Genomics Germany
hs RUNX2 FW; Sequenz: CTG TGG TTA CTG TCA TGG CG	Eurofins Genomics Germany
hs RUNX2 RV; Sequenz: AGG TAG CTA CTT GGG GAG GA	Eurofins Genomics Germany
hs SPARC FW; Sequenz: AGT GGA GTT GGT GAA TCG GT	Eurofins Genomics Germany
hs SPARC RV; Sequenz: AAC GAG TTC TCA GCC TGT GA	Eurofins Genomics Germany

9.5 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller, Adresse
T-75 Zellkulturflasche 250 ml, 75 cm ²	Greiner Bio-One Cellstar® Germany
Pipetten: 5 ml Costar® Stripette® 10 ml Costar® Stripette® 25 ml Costar® Stripette®	Corning® Costar® USA
Pasteurpipetten Glas - 230 mm ohne Wattestopfen	A. Hartenstein GmbH Würzburg, Germany

24-Well Plate, with Lid Flat Bottom Ultra – Low Attachment Surface	Corning® Costar® USA
96-Well Plate, with Lid Flat Bottom Ultra – Low Attachment Surface	Corning® USA
96-Well Microplate, PS, F-Bottom, Clear	Greiner Bio-One Germany
96-Well PCR Platte, weiß Semi Skirt, Low Profile, Eckschnitt A12 DNA-, DNase-, RNasefrei	Biozym Scientific GmbH Germany
Reagenzgefäße: 15 ml 50 ml	Greiner Bio-One Cellstar® Tubes Germany
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied biosystems by Thermo Fisher Scientific Waltham, USA
Trypan Blau (0,4%)	Gibco USA
Eppendorf Tubes Zentrifugationsröhrchen 1,5ml	Eppendorf SE Hamburg, Germany
Luna™ Cell Counting Slides	Logos Biosystems Korea
Tube Strips 0,2ml with Domed Cap Strips	VWR peqlab Darmstadt, Germany
TipOne Pipettenspitzen steril 10µl 200µl 1000µl	Starlab Group Germany

10 Anhang

10.1 Publikation im International Journal of Bioprinting



International Journal of Bioprinting

RESEARCH ARTICLE

A new 3D-printed polylactic acid-bioglass composite for bone tissue engineering induces angiogenesis *in vitro* and *in ovo*

Simon Cichos¹, Eva Schätzlein², Nadine Wiesmann-Imilowski^{3,4},
Andreas Blaeser^{2,5}, Dirk Henrich⁶, Johannes Frank⁶, Philipp Drees¹,
Erol Gercek¹, Ulrike Ritz^{1*}

¹Department of Orthopedics and Traumatology, University Medical Center Mainz, Mainz, Germany

²Technical University of Darmstadt, Institute for BioMedical Printing Technology, Darmstadt, Germany

³Department of Otorhinolaryngology, University Medical Center Mainz, Mainz, Germany

⁴Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University Medical Center Mainz, Mainz, Germany

⁵Technical University of Darmstadt, Centre for Synthetic Biology, Darmstadt, Germany

⁶Department of Trauma, Hand and Reconstructive Surgery, Goethe University Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany

(This article belongs to the *Special Issue: Advances in the Application of Bioprinted Biomaterials in Tissue Engineering*)

Abstract

Large bone defects such as those that occur after trauma or resections due to cancer still are a challenge for surgeons. Main challenge in this area is to find a suitable alternative to the gold-standard therapy, which is highly risky, and a promising option is to use biomaterials manufactured by 3D printing. In former studies, we demonstrated that the combination of polylactic acid (PLA) and bioglass (BG) resulted in a stable 3D-printable material, and porous and finely structured scaffolds were printed. These scaffolds exhibited osteogenic and anti-inflammatory properties. This 3D-printed material fulfills most of the requirements described in the diamond concept of bone healing. However, the question remains as to whether it also meets the requirements concerning angiogenesis. Therefore, the aim of this study was to analyze the effects of the 3D-printed PLA-BG composite material on angiogenesis. *In vitro* analyses with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) showed a positive effect of increasing BG content on viability and gene expression of endothelial markers. This positive effect was confirmed by an enhanced vascular formation analyzed by Matrigel assay and chicken chorioallantoic membrane (CAM) assay. In this work, we demonstrated the angiogenic efficiency of a 3D-printed PLA-BG composite material. Recalling the osteogenic potential of this material demonstrated in former work, we manufactured a mechanically stable, 3D-printable, osteogenic and angiogenic material, which could be used for bone tissue engineering.

Keywords: 3D printing; Polylactic acid; Bioglass; Angiogenesis; Vascular formation; *In ovo* CAM assay

*Corresponding author:
Ulrike Ritz (ritz@uni-mainz.de)

Citation: Cichos S, Schätzlein E, Wiesmann-Imilowski N, *et al.*, 2023, A new 3D-printed polylactic acid-bioglass composite for bone tissue engineering induces angiogenesis *in vitro* and *in ovo*. *Int J Bioprint*. <https://doi.org/10.18063/ijb.751>

Received: February 03, 2023

Accepted: March 04, 2023

Published Online: May 11, 2023

Copyright: © 2023 Author(s). This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, permitting distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Publisher's Note: Whioce Publishing remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

1. Introduction

Large bone defects that occur after trauma or resections due to cancer still are a challenge for surgeons. Often these defects do not heal without supportive therapy, and consequently, the risk to develop nonunions is immense. Autologous bone grafting is the gold standard of therapy for this condition; however, this therapy not only necessitates subsequent surgeries for the patient, but is also associated with side effects and high costs. Moreover, the amount of material is limited^[1]. Although some other therapies like reamer-arrigator-aspirator (RIA) systems are getting more and more important^[2], main challenge in this area is to find a suitable alternative to the gold-standard therapy, which is highly risky.

One option is to use biomaterials manufactured by 3D printing. Many 3D-printable biopolymers like polylactic acid (PLA), polycaprolacton (PCP), poly lactide-co-glycolide (PGLA), or others are suitable for applications in bone tissue engineering as they are biocompatible, biodegradable, and mechanically stable, but they are not bioactive^[3]. One possibility is to combine these materials, for example, polylactide, with bioactive materials like hydroxyapatite (HA)^[4], tricalcium phosphate (TCP)^[5], or bioglass (BG)^[6], resulting in composite demonstrating high osteoconductivity and osteoinductive properties, which are however not printable by themselves. Especially, bioglass is an interesting ionic compound in this context. Bioactive glasses were discovered in 1969 and represent an interesting alternative implant material. 45S5 bioglass (BG) has already been used clinically as it stimulates osteogenesis and forms a strong bond with host tissues^[7].

BG has been combined with many different materials, for example, various hydrogels^[8], graphene oxide^[9], or polycaprolactone^[10], from which it is released and induces osteogenic properties^[11]. By combining PLA and bioglass, it might be possible to combine the positive characteristics of these materials and overcome their negative aspects.

Back in early 2000s, it was reported that the combination of BG and PLA demonstrated positive effects on bone regeneration^[12-14]. The combination of both materials to form a printable composite is a new research area and was reported firstly by Roether *et al.*^[14] and Alksne *et al.*^[6], who observed high cytocompatibility and osteoinductive properties of the printed PLA-BG scaffolds. Another advantage of the combined material is the degradation process. PLA has been shown to degrade into acid products that might limit tissue regeneration. However, the alkaline nature of BG reduces the acidic side effects of these degradation products^[15].

We have recently manufactured a printable material consisting of PLA and increasing concentrations of S53P4

BG up to 20% (w/w). This material was suitable to print complex, porous, and finely structured scaffolds using standard Cartesian 3D printers. In the first step, the porous structure of the material was described, and the mechanical stability was proven^[16], showing the potential of this new material. We demonstrated an even distribution of the BG particles within the PLA matrix and a prolonged release of calcium from this material, which increased with BG concentrations. Adhesion of mesenchymal stem cells (MSC) and their osteogenic as well as anti-inflammatory properties increased with increasing BG content of the composite. Accordingly, whole blood stimulation assays followed by protein array analysis revealed no significant inflammatory potential^[17,18]. A BG concentration-dependent calcium release from this material^[17,16] mediates at least some of the observed effects^[18].

Thus, this 3D-printed material fulfills most of the requirements as described in the diamond concept of bone healing—being osteoinductive, osteogenetic, and mechanically stable^[19]. However, the question remains as to whether it also meets the requirements concerning angiogenesis^[20]. Bone fracture healing is a multifactorial process, with angiogenesis being a key aspect. Without vascularization of the implanted biomaterial, neither bone healing nor any tissue regeneration can take place^[21,22]. Known factors involved in formation of vasculature are, for example, stromal derived factor-1 (SDF-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF), which also regulate the neoangiogenesis of newly formed bone^[22,23]. Further factors or materials that induce angiogenesis are promising to be used in dual-delivery systems to induce angiogenesis in combination with osteogenesis. Further factors or materials are promising to be used in dual-delivery systems to induce angiogenesis in combination with osteogenesis. For example, PLGA was combined with various molecules, for example, VEGF^[24,25].

One example besides PLA is the combination of PGLA with various bioactive molecules, for example, VEGF^[24,25].

It has been demonstrated in various studies that BG, as one part of composite materials, has positive effects on wound healing^[26] and angiogenesis. In combination with collagen, BG induced vascularization of adipose tissue-derived stem cells^[27]. Moreover, Deb *et al.*^[28] reported co-culture of human osteoblasts and endothelial cells on ceramic-BG scaffolds. Stähli *et al.* and Eldesoqi *et al.* observed a positive effect of BG released from composite materials on endothelial cell morphogenesis^[29,30]. A positive effect has also been described for osteochondral regeneration^[31].

Therefore, the aim of this study was to analyze the effects of the 3D-printed PLA-BG composite material on

angiogenesis. First, *in vitro* analyses with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were performed to characterize viability and gene expression of endothelial markers. Differentiation capacity of HUVECs in response to the BG fraction in the test specimen was evaluated by means of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The effect of the biomaterials on vascular formation was analyzed by Matrigel assay and chicken chorioallantoic membrane (CAM) assay. The goal of this study was to detect whether the 3D-printed PLA-BG composite scaffolds are able to induce angiogenesis in addition to the already detected enhancement of osteogenesis.

2. Methods

2.1. Filament fabrication

Composite filaments of PLA and BG were fabricated as described before^[17]. Shortly, PLA granules (PLA-filament Kristall Natur, 3dk.berlin, Berlin, Germany) with a grain size of 2–5 mm and bioglass Type S53P4 (bioglass composition: 53% SiO₂, 23% Na₂O, 20% CaO, 4% P₂O₅, BonAlive Biomaterials Ltd., Turku, Finland) with a grain size of 25–42 µm were mixed manually to obtain compositions with BG content of 0, 5, 10, and 20% (w/w). For filament extrusion, a desktop filament extruder (NEXT 1.0 Advanced, 3devo B.B., Utrecht, the Netherlands) was used. Screw speed was set to 4 U/min and fan speed to 65%. The speed of the conveying mechanism was set to automatic to achieve the desired filament diameter of 1.75 mm.

2.2. Sample fabrication

Two-dimensional round scaffolds of each PLA-BG composite were printed using fused filament fabrication on a 3D printer (i3 MK3S, Prusa Research, Prague, Czech Republic) with a nozzle diameter of 0.4 mm. Filaments were dried at 40°C for at least 12 h. Sample geometries were designed with computer-aided design software NX 12 (Siemens NX 12, Siemens AG, Berlin and Munich, Germany) and preprocessed with Cura Ultimaker v.4.6. (Ultimaker, Utrecht, the Netherlands). A flat disk consisting of two layers with a diameter of 0.5 cm was printed and used for further experiments.

2.3. Biocompatibility assessment

In vitro cytotoxicity was analyzed analogous to ISO 10993-5 using the MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid]) assay. Mouse L929 cells (20,000 cells/well) were seeded in a 96-well tissue culture plate for 24 h. PLA-BG disks were incubated in 120 µL cell media for 48 h. About 100 µL of this extract were given to L929 cells in the 96-well plate. After an incubation time of 24 h, the MTT assay was performed and the colorimetric readout was performed at a wavelength of 570 nm (reference wavelength 650 nm). Zinc diethyl

dithiocarbamate (ZDEC) and zinc dibutyl dithiocarbamate (ZDBC) (Food and Drug Safety Center, Hatano Research Institute, Hadano, Japan) were used as positive controls as they induce a reproducible cytotoxic reaction.

2.4. Cell culture and microscopy

HUVECs were purchased from Promocell (Heidelberg, Germany) and cultured in complete EBM-2 medium (Promocell, Heidelberg, Germany) as recommended by the supplier. For microscopic observations after seeding on PLA-BG samples, cells were labeled with Cell Tracker™ Green according to the manufacturer's instructions (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). $2 \times 10^5/0.2$ cm² HUVECs were seeded onto the different PLA-BG disk and cultivated overnight. The next day cell detection was performed with the EVOS® Digital Inverted Microscope (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

2.5. Viability

Cell viability was tested with the alamarBlue® assay. $2 \times 10^5/0.2$ cm² HUVECs were seeded onto the different PLA-BG disk and cultivated overnight. The alamarBlue® assay (Gibco®Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was performed 1 and 4 days after seeding. For this purpose, cells were incubated with 320 µL of a 10% alamarBlue solution in medium for 4 h at 37°C. Subsequently, 100 µL of the supernatant was transferred to a 96-well plate, and the absorbance (presented as fluorescence intensity) of each was measured at 560/600 nm.

2.6. PCR

$5 \times 10^4/0.2$ cm² HUVECs were seeded onto PLA-BG disks and detached with accutase the next day. The cell suspensions were centrifuged at 1,400 rpm for 5 min and the cell pellet was stored at -80°C for future use. Isolation of RNA was performed using PeqGold Total RNA Micro Kit (PeqLab) according to manufacturer's instruction. Total RNA (1 µg) was reverse-transcribed into cDNA using dNTPs (4you4 dNTPs Mix (10 mM), BIORON GmbH, Ludwigshafen), Random Primers (Promega, Madison, WI, USA), and MuLV RT (M-MuLV Reverse Transcriptase, M0253S New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. For gene expression analyses, cDNA template underwent PCR amplification (40 cycles) using the SYBR Green (PowerUp™ SYBR® Green master mix, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and sequence-specific primers (primer sequences listed in Table 1). *GAPDH* was used for normalization, and results were calculated using the well-established $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method^[32].

2.7. Matrigel assay

In this experiment, a series of conditioned media containing pure PLA and BG in different concentrations were prepared

Table 1. Primer sequences

Gene	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
<i>GAPDH</i>	CGA CCA CTT TGT CAA GCT CA	AGG GGA GAT TCA TGT TGG TG
<i>CD31</i>	CAT TGG CGT GTT GGG AAG AA	GCT CAT GTT TGC CTA GCT CC
<i>KDR</i>	TTA CTT GCA GGG GAC AGA GG	TTC CCG GTA GAA GCA CTT GT

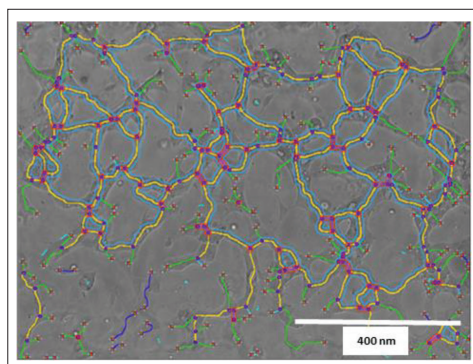


Figure 1. Example of Matrigel analysis^[33]. Yellow lanes show the segments, while pink circles represent junctions.

by incubating the media for 48 h so that all solutes can be fully absorbed. $5 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ HUVECs were mixed with Matrigel® solution in a 1:1 ratio and then incubated for 30 min to allow the Matrigel® to take its solid form. Afterward, 200 μL of the additive medium was pipetted into each well and incubated for 24 h. The following day, photos were taken under the microscope (EVOS®) and analyzed using ImageJ® (Angiogenesis Analyzer; Figure 1^[33]).

2.8. CAM assay

Previous studies have already proven that the CAM assay is well suited for assessing the biocompatibility of biomaterials as well as their angiogenic potential^[34,35]. Hens' eggs (Leghorn) were stored horizontally in an incubator (Brutmaschinen Janeschitz GmbH, Hammelburg, Germany) at 37.5°C for 3 days. On day 3 of egg development (EDD 3), 5–6 mL of albumin was removed with a sterile 10-mL syringe and a 21-G \times 1-1/2" needle (0.8 \times 40 mm) (BD Microlance™ Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) from the blunt end. After albumin removal, the eggshell was opened at the top with autoclaved scissors and subsequently covered with ParafilmVR (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to prevent evaporation. On day 8 of egg development (EDD 8), PLA-BG disks were placed onto the CAM. Six days after placement fluorescence microscopy was performed, the eggs were placed horizontally under a microscope (Olympus

BXFM, OLYMPUS DEUTSCHLAND GmbH, Hamburg, Germany). The analysis of the vascular density was carried out using ImageJ^[33].

2.9. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the software GraphPad Prism. The results are presented as medians and quartiles. Measurements were carried out in triplicates. Cell-based experiments were independently repeated three times. Normally distributed data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). Depending on Levene's test for equality of variances, pairwise comparisons were conducted either by a Tukey–HSD or Games–Howell *post hoc* test. In contrast, non-normally distributed data were evaluated with the Kruskal–Wallis test followed by a Bonferroni-corrected Conover–Iman analysis. For pairwise comparisons, the Mann–Whitney *U* test was used. $P < 0.05$ was considered statistically significant ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.005$, and $****P < 0.001$). Due to multiple testing, the *P*-values were adjusted through Bonferroni–Holm method.

3. Results and discussion

3.1. Sample fabrication

Scanning electron microscopy (SEM) images of the filament were taken, which demonstrate an even distribution of BG particles. For *in vitro* and *in ovo* analyses, simple cylindrical structures containing two layers, with a diameter of 5 mm and a height of 300 μm were printed (Figure 2 and ref. ^[17]).

3.2. Biocompatibility

In order to ensure biocompatibility of the different PLA–BG scaffolds, the scaffolds were incubated in medium for 48 h, and the resulting supernatants were transferred to L929 cells seeded in 96-well plate for 24 h. After 24 h, in accordance to ISO-10993-5 (“Biological evaluation of medical devices”), a MTT assay was performed. Figure 3 shows the cell viability in different PLA–BG scaffolds compared to controls; the cytotoxic controls show no viability.

3.3. Adhesion

To detect whether BG supports the adhesion capacity of endothelial cells on PLA disks, cells labeled with CellTracker™ Green were seeded on PLA scaffolds with BG in different concentrations. With increasing BG

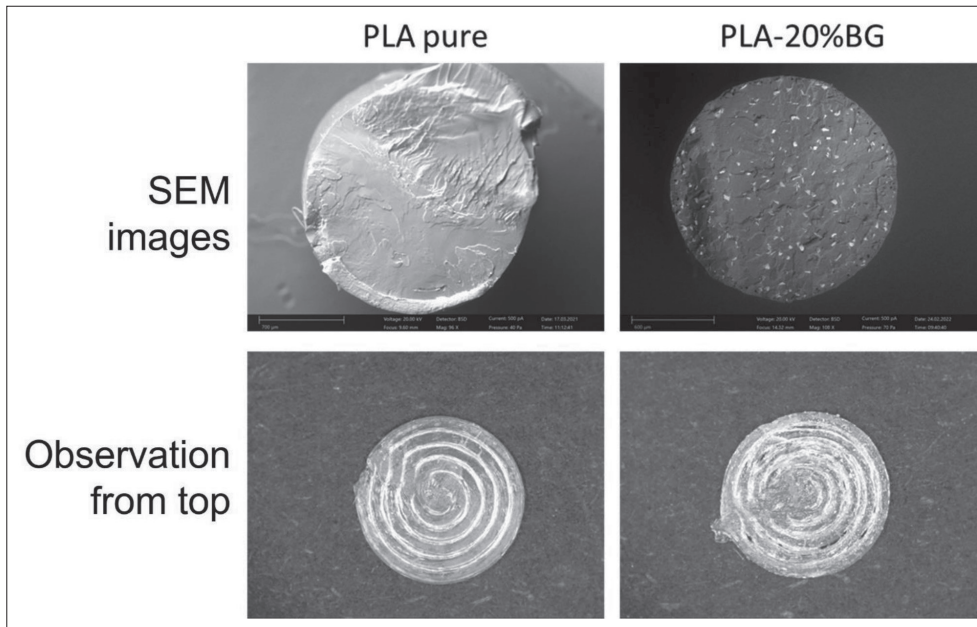


Figure 2. SEM images and gross observation of the 3D-printed PLA pure and PLA-20%BG composite scaffolds.

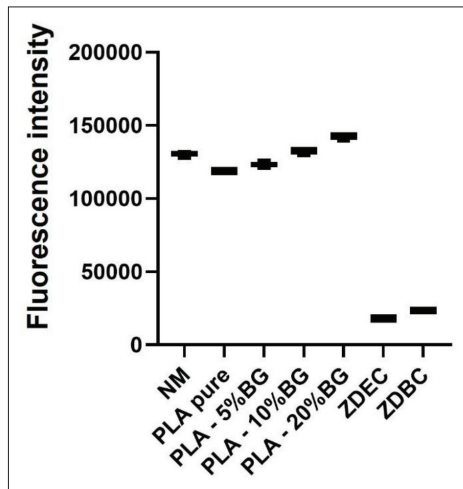


Figure 3. MTT tests performed analogous to ISO 10993-5 confirmed the biocompatibility of all four PLA scaffolds without and with BG in different concentrations. Significant differences were only observed when compared to the cytotoxic controls. NM: normal cultivation medium; ZDEC and ZDBC: cytotoxic controls.

content, an increase in the number of adhered cells could be observed (Figure 4).

3.4. Viability

The positive effect of BG inclusion to PLA was confirmed by viability assays (alamarBlue assay) 1 and 4 days after seeding. On both days, viability of HUVECs on scaffolds with 10% and 20% BG was significantly increased compared to PLA pure and also to PLA-5%BG (day 4; Figure 5). Viability increased significantly on PLA-20%BG from day 1 to day 4, which manifested the best effect in terms of cell viability with respect to other scaffolds with different BG concentrations.

Few studies have analyzed the effect of BG on the viability and proliferation of HUVECs. Li *et al.*^[26] tested BG ion extracts in different dilutions on HUVECs proliferation and showed that higher BG concentrations suppressed proliferation of HUVECs. However, their application method is hardly comparable to our experiments as their intention was to induce wound healing. Another study used BG-PVA (polyvinyl alcohol) scaffolds in the ratios of 4:1 and 3:1 and demonstrated an increased proliferation of a HUVEC-hOB coculture in comparison to HA scaffolds^[28]. Some studies incorporated BG in different hydrogels and reported positive effects on endothelial cell

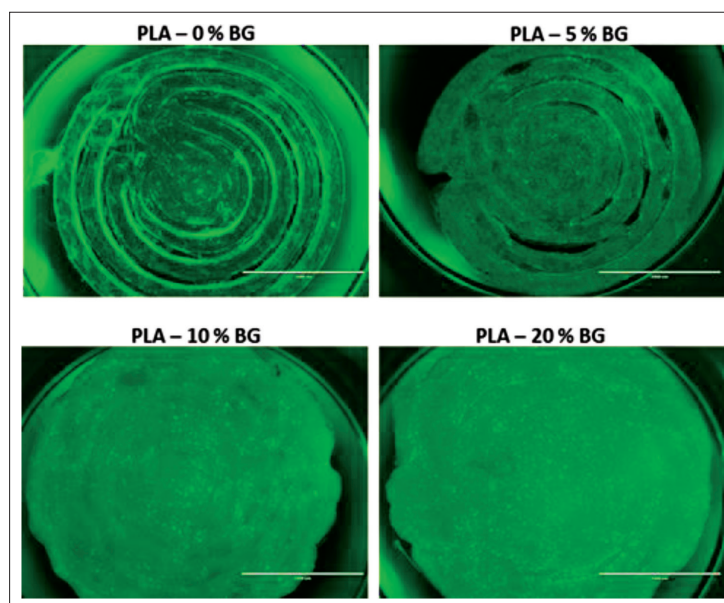


Figure 4. Adhesion of HUVECs (green) to PLA-BG disks. Scale bar: 2 mm.

adhesion and growth as well as on vascularization and wound healing^[36,37]. The basic concepts of these studies are comparable to our experimental approach and confirm the positive effect of BG on angiogenesis.

3.5. Gene expression

To confirm the results of the adhesion and viability assays, gene expression analyses of the two endothelial markers *CD31* and *KDR* (kinase insert domain receptor) were performed. Considering the results from this study as well as from the studies regarding osteogenesis, one can conclude that the lowest concentration of BG has no effect on osteogenic or endothelial cells. The group with the lowest BG concentration of 5% was excluded from further studies. Only PLA with BG concentrations from 10% and 20% were used for the following experiments.

Gene expression of both endothelial markers was enhanced in both PLA-10%BG and PLA-20%BG groups when compared to pure PLA-scaffolds. PLA-20%BG showed the highest expression of these endothelial markers (Figure 6). *KDR* expression seems to be lower on day 4 on PLA-20%BG compared to PLA-10%BG; however, the difference is not statistically significant, whereas the difference to PLA pure group is statistically significant.

As already stated before, only few studies have analyzed the effect of BG on vascular gene expression. It has been shown that human dental stromal cells demonstrated a higher gene expression of *CD34*, *CD31*, and *KDR* in 3D BG constructs^[38]. This research group also detected osteogenic effects in the same scaffold^[39]. Li *et al.*^[26] observed a positive effect on gene expression of *FGF* (fibroblast growth factor), *VEGF* and *KDR* in HUVECs after being seeded on BG-PVA scaffolds.

3.6. Angiogenesis assay (Matrigel assay)

To analyze the differentiation capacity of PLA-BG scaffolds, Matrigel assays were performed to quantify tube formation^[33,40]. This assay is easy to perform, easy to analyze and quantify, and highly reproducible. Another advantage is that endothelial cells attach within 1 h and start to form tubes as well as cell-cell contacts within 12–24 h^[41].

Exemplary illustrations of HUVECs seeded in Matrigel® and incubated with conditioned medium from the three PLA-BG scaffolds (0%, 10%, and 20% BG) are shown in Figure 7A. Figure 7B demonstrates the quantitative analysis showing that all three analyzed components (number of junctions, number of segments, and total length) increased with BG content in the 3D-printed scaffolds (Figure 7).

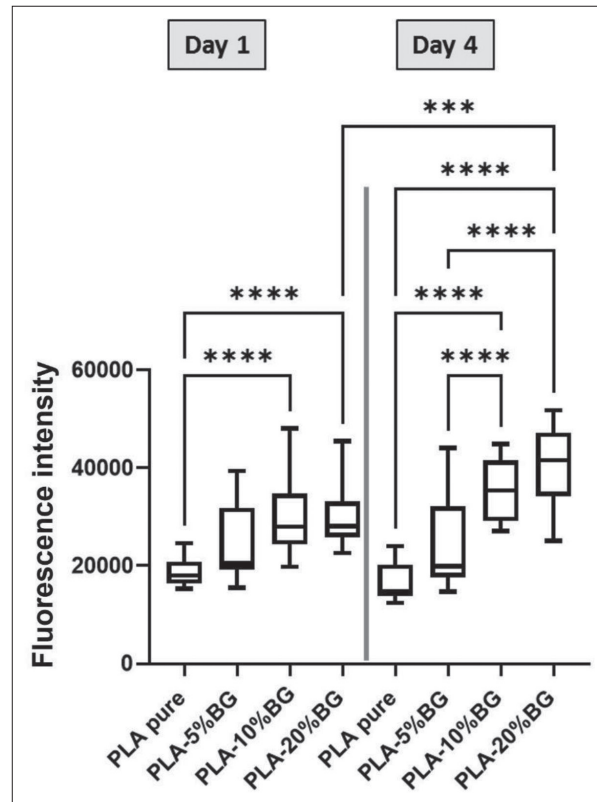


Figure 5. Viability of HUVECs seeded on PLA–BG disks measured with the alamarBlue assay. Viability (presented as fluorescence intensity) increased with BG concentration in the test specimen on day 1 and day 4 in comparison to control. Results are expressed as median and quartiles ($n = 9$). Mann–Whitney U tests revealed significant differences ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.005$; $****P < 0.001$). For a better overview, only the significant differences are indicated.

Until now, there are no quantitative data concerning the effects of BG on angiogenesis tested with Matrigel assay. To sum up the *in vitro* results, we can clearly state that the 3D-printed PLA disks with a BG content of 10% or 20% induce angiogenic properties.

3.7. CAM assay

To analyze the neo-vessel formation around the scaffolds as well as its integration into the vascular network, a CAM assay was performed. The CAM assay is a simple, fast, and low-cost model to test angiogenesis *in vivo*^[42]. It is an attractive alternative to small animal models and respects the guidelines for a reduction of animal numbers and experiments^[43]. Moreover, compared to small animal models, where periods of up to 6 weeks are necessary, the

neoangiogenesis on the CAM can be analyzed after 3–7 days^[44,45].

Determination of the vascular density around the scaffold showed a significantly higher density 7 days after placement of the PLA–20%BG disks compared to the pure PLA and the PLA–10%BG discs (Figure 8). As negative control, the PLA pure was used. A control without scaffold has not been used as the material itself influences the CAM by friction and weight. Neoangiogenesis around the scaffold was measured to show the effect of the scaffold on vascularization.

Determination of the vascular density around the scaffold demonstrated a significantly higher density 7 days after placement of the PLA–20%BG disks compared to the pure PLA and the PLA–10%BG disks (Figure 8).

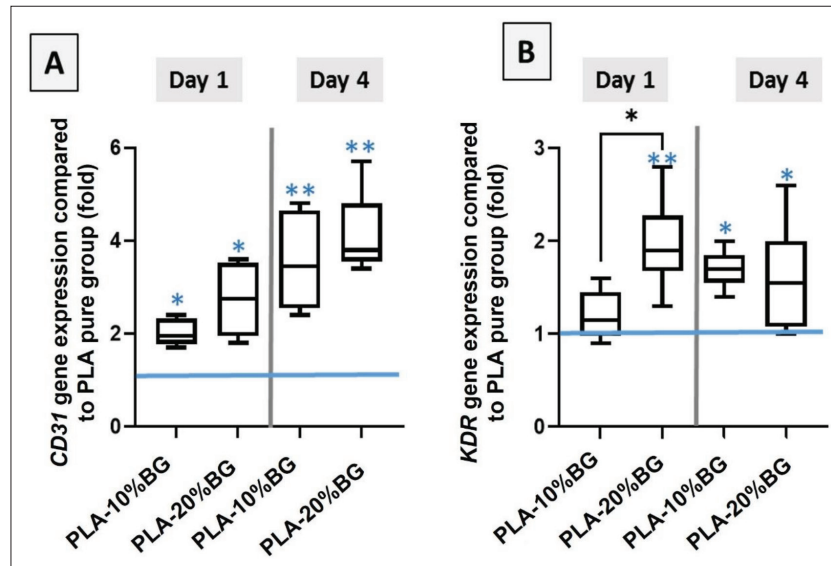


Figure 6. Gene expression analyses on PLA-10%BG and PLA-20%BG on day 1 and day 4 after seeding of HUVECs. Mann-Whitney *U* tests revealed significant differences (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$, **** $P < 0.001$). Black asterisk demonstrates significant difference between the PLA-10%BG and PLA-20%BG groups; light blue asterisk represents the significant difference compared to PLA pure group (blue line = 1). For a better overview, only the significant differences are indicated.

Only few studies have analyzed the effect of BG *in ovo*. Cohrs *et al.*^[46] analyzed silicone elastomers blended with BG nano- (nBG) or micro-particles (mBG) *in ovo*. They found that nBG and mBG were better integrated into the membrane, but they displayed a lower vascular density. This group worked with a low BG concentration of 5%, a concentration with which we could not detect any positive effects on angiogenesis *in vitro*. Adipose tissue-derived stem cells seeded on a combination of polypropylene and BG demonstrated increased vascularization in the CAM assay, as measured by tube length^[27]. Other groups used the CAM assay to show the biocompatibility or bone mineralization potential of BG-based scaffolds^[47].

Besides the fact that the CAM assay demonstrates the positive effect on angiogenesis, this assay also confirms the biocompatibility of the PLA-BG material. The CAM assay is a well-accepted method to prove the biocompatibility of biomaterials and tissue-engineered constructs *in ovo* and *in vivo*^[48,49]. It has been demonstrated that PLA and BG can be used as composite material and that the shape can be customized by 3D printing^[50]. One advantage of 3D printing is the variation capacity—thickness, diameter, and pore size can be modified depending on the application. All these parameters can affect osteogenesis as well as

angiogenesis as described before^[25,51,52]. To analyze these parameters, the PLA-BG composite material will be applied in a follow-up *in vivo* study in a femur defect in the rat to further define the biocompatibility as well as the effect of different thicknesses and pore sizes in the scaffold. Another topic that will be analyzed in the animal model is the osteoimmunity regulating effects of the scaffold as it has been demonstrated that PLA/HA scaffolds induce osteoimmunity^[53].

In the present study, we showed that the 3D-printed PLA-BG, especially at a BG concentration of 20%, induces angiogenesis *in vitro* with endothelial cells (HUVECs) as well as *in ovo*, as demonstrated in the CAM assay. PLA has been established as a degradable implant material in various biomedical areas like bone fixation, surgical implants, or scaffolds for bone tissue engineering^[54]. However, there have been criticisms regarding the acidic pH following degradation of the scaffold^[55], which has been disproven in a long-term study on horses^[56]. By combining PLA with BG, the acidic degradation products are even further neutralized^[55]. Another positive effect of the encapsulation of BG in PLA is the slower and continuous release of components. Other studies reported a very fast release rate causing cytotoxic effects^[57]. The released ions from BG are

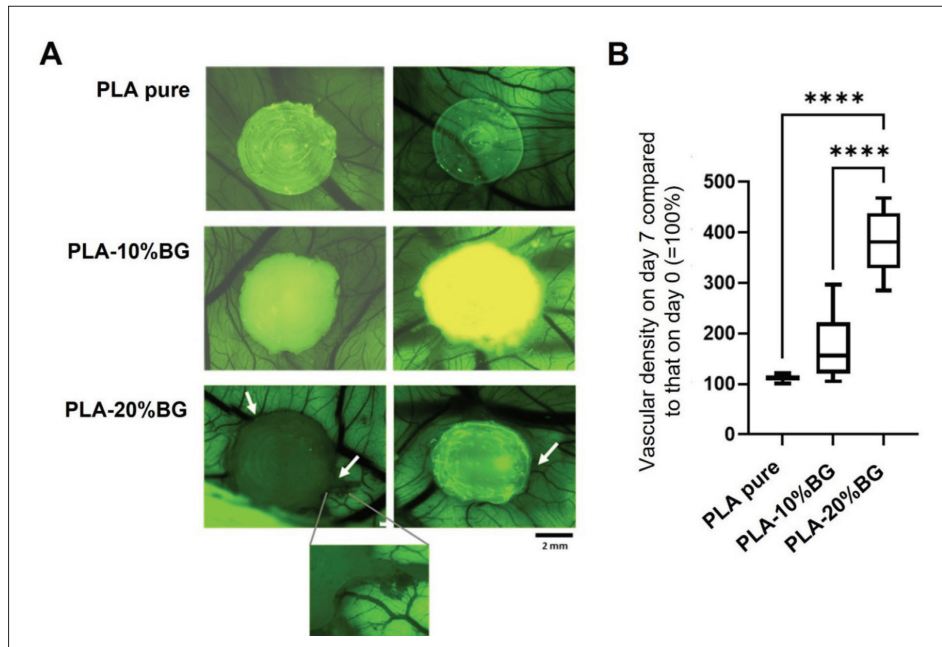


Figure 8. CAM assay. (A) Exemplary microscope images after 7 days of placement. (B) Quantification of vascular density. Mann-Whitney U tests revealed significant differences ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.005$, $****p < 0.001$). For a better overview, only the significant differences are indicated.

Si, Ca, Na, and P^[17,58], and it has been proposed that the release of these ions positively affects the osteogenesis as well as the angiogenic potential of human cells^[47,58].

4. Conclusion and outlook

In this work, we demonstrated the angiogenic efficiency of a 3D-printed PLA–BG composite material, as an addition to our earlier work on the osteogenic potential of this material^[16,17]. Taken together, we manufactured a mechanically stable, 3D-printable, osteogenic, and angiogenic material, which could be used for bone tissue engineering. *In vivo* analyses will be performed in future studies to confirm the *in vitro* results regarding biocompatibility and the osteogenic as well as angiogenic effects. Moreover, the degradability of the PLA–BG composite material will also be determined in the *in vivo* experiments.

In further work, we will also determine the antimicrobial activity of the 3D-printed composite material as it has been shown that BG inhibits the growth of various bacterial strains^[59]. As infections are still a major problem in implant surgery, a material combining osteogenic, angiogenic, and

antibacterial properties would solve many problems in this area.

Acknowledgments

We thank Simone Mender, Department of Otorhinolaryngology, University Medical Center Mainz, for support with the CAM assays.

Funding

This research was funded by RMU-Initiativfond Forschung (Förderlinie 2).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

Conceptualization: Ulrike Ritz, Dirk Henrich, Eva Schätzlein, Andreas Blaeser, Johannes Frank

Data curation: Simon Cichos

Formal analysis: Ulrike Ritz, Nadine Wiesmann-Imilowski

Funding acquisition: Ulrike Ritz, Dirk Henrich, Andreas Blaeser, Johannes Frank, Philipp Drees, Erol Gercek

Investigation: Simon Cichos, Nadine Wiesmann-Imilowski

Methodology: Simon Cichos, Eva Schätzlein, Nadine Wiesmann-Imilowski

Project administration: Ulrike Ritz, Dirk Henrich, Andreas Blaeser

Resources: Eva Schätzlein, Ulrike Ritz, Dirk Henrich, Andreas Blaeser, Philipp Drees, Erol Gercek

Supervision: Ulrike Ritz, Dirk Henrich, Andreas Blaeser

Validation: Ulrike Ritz

Visualization: Ulrike Ritz, Eva Schätzlein, Johannes Frank, Dirk Henrich

Writing – original draft: Ulrike Ritz, Simon Cichos

Writing – review & editing: Eva Schätzlein, Nadine Wiesmann-Imilowski, Andreas Blaeser, Dirk Henrich, Johannes Frank, Philipp Drees, Erol Gercek

All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

References

- Karalashvili L, Kakabadze A, Uhryn M, *et al.*, 2018, Bone grafts for reconstruction of bone defects (review). *Georgian Med News*, 282:44–49.
- Schmidt AH, 2021, Autologous bone graft: Is it still the gold standard? *Injury*, 52(Suppl 2):S18–S22.
<https://doi.org/10.1016/j.injury.2021.01.043>
- Arif ZU, Khalid MY, Noroozi R, *et al.*, 2022, Recent advances in 3D-printed polylactide and polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering applications. *Int J Biol Macromol*, 218:930–968.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.140>
- Kaya I, Sahin MC, Cingoz ID, *et al.*, 2019, Three dimensional printing and biomaterials in the repairment of bone defects; hydroxyapatite PLA filaments. *Turk J Med Sci*, 49(3):922–927.
<https://doi.org/10.3906/sag-1901-184>
- Liu T, Li B, Chen G, *et al.*, 2022, Nano tantalum-coated 3D printed porous polylactic acid/beta-tricalcium phosphate scaffolds with enhanced biological properties for guided bone regeneration. *Int J Biol Macromol*, 221:371–380.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.003>
- Alksne M, Kalvaityte M, Simoliunas E, *et al.*, 2020, In vitro comparison of 3D printed polylactic acid/hydroxyapatite and polylactic acid/bioglass composite scaffolds: Insights into materials for bone regeneration. *J Mech Behav Biomed Mater*, 104:103641.
<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.103641>
- Hench LL, Jones JR, 2015, Bioactive glasses: Frontiers and challenges. *Front Bioeng Biotechnol*, 3:194.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00194>
- Zare S, Mohammadpour M, Izadi Z, *et al.*, 2022, Nanofibrous hydrogel nanocomposite based on strontium-doped bioglass nanofibers for bone tissue engineering applications. *Biology (Basel)*, 11(10).
<https://doi.org/10.3390/biology11101472>
- Kumari S, Singh D, Srivastava P, *et al.*, 2022, Generation of graphene oxide and nano-bioglass based scaffold for bone tissue regeneration. *Biomed Mater*, 17(6).
<https://doi.org/10.1088/1748-605X/ac92b4>
- Kukulka EC, de Souza JR, de Araujo JCR, *et al.*, 2023, Polycaprolactone/chlorinated bioglass scaffolds doped with Mg and Li ions: Morphological, physicochemical, and biological analysis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 111(1):140–150.
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.35140>
- Daskalakis E, Huang B, Vyas C, *et al.*, 2022, Novel 3D bioglass scaffolds for bone tissue regeneration. *Polymers (Basel)*, 14(3).
<https://doi.org/10.3390/polym14030445>
- Blaker JJ, Gough JE, Maquet V, *et al.*, 2003, In vitro evaluation of novel bioactive composites based on bioglass-filled polylactide foams for bone tissue engineering scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, 67(4):1401–1411.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.20055>
- Maquet V, Boccaccini AR, Pravata L, *et al.*, 2003, Preparation, characterization, and in vitro degradation of bioresorbable and bioactive composites based on bioglass-filled polylactide foams. *J Biomed Mater Res A*, 66(2):335–346.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.10587>
- Roether JA, Boccaccini AR, Hench LL, *et al.*, 2002, Development and in vitro characterisation of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and bioglass for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 23(18):3871–3878.
[https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00131-x](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00131-x)

15. Lyyra I, Leino K, Hukka T, *et al.*, 2021, Impact of glass composition on hydrolytic degradation of polylactide/bioactive glass composites. *Materials (Basel)*, 14(3).
<https://doi.org/10.3390/ma14030667>
16. Söhling N, Neijthoff J, Nienhaus V, *et al.*, 2020, 3D-printing of hierarchically designed and osteoconductive bone tissue engineering scaffolds. *Materials (Basel)*, 13(8).
<https://doi.org/10.3390/ma13081836>
17. Schätzlein E, Kicker C, Söhling N, *et al.*, 2022, 3D-printed PLA-bioglass scaffolds with controllable calcium release and MSC adhesion for bone tissue engineering. *Polymers (Basel)*, 14(12).
<https://doi.org/10.3390/polym14122389>
18. Söhling N, Al Zoghool S, Schätzlein E, *et al.*, 2022, In vitro evaluation of a 20% bioglass-containing 3D printable PLA composite for bone tissue engineering. *Int J Bioprint*, 8(4):602.
<https://doi.org/10.18063/ijb.v8i4.602>
19. Giannoudis PV, Atkins R, 2007, Management of long-bone non-unions. *Injury*, 38(Suppl 2):S1–S2.
20. Andrzejowski P, Giannoudis PV, 2019, The 'diamond concept' for long bone non-union management. *J Orthop Traumatol*, 20(1):21.
<https://doi.org/10.1186/s10195-019-0528-0>
21. Mahapatra C, Kumar P, Paul MK, *et al.*, 2022, Angiogenic stimulation strategies in bone tissue regeneration. *Tissue Cell*, 79:101908.
<https://doi.org/10.1016/j.tice.2022.101908>
22. Rather HA, Jhala D, Vasita R, 2019, Dual functional approaches for osteogenesis coupled angiogenesis in bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 103:109761.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109761>
23. Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P, 2007, Molecular aspects of fracture healing: Which are the important molecules? *Injury*, 38(Suppl 1):S11–S25.
<https://doi.org/10.1016/j.injury.2007.02.006>
24. Zhao D, Zhu T, Li J, *et al.*, 2021, Poly(lactic-co-glycolic acid)-based composite bone-substitute materials. *Bioact Mater*, 6(2):346–360.
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.08.016>
25. Zhu T, Jiang M, Zhang M, *et al.*, 2022, Biofunctionalized composite scaffold to potentiate osteoconduction, angiogenesis, and favorable metabolic microenvironment for osteonecrosis therapy. *Bioact Mater*, 9:446–460.
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.08.005>
26. Li H, He J, Yu H, *et al.*, 2016, Bioglass promotes wound healing by affecting gap junction connexin 43 mediated endothelial cell behavior. *Biomaterials*, 84:64–75.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.033>
27. Handel M, Hammer TR, Nooaeid P, *et al.*, 2013, 45S5-bioglass((R))-based 3D-scaffolds seeded with human adipose tissue-derived stem cells induce in vivo vascularization in the CAM angiogenesis assay. *Tissue Eng Part A*, 19(23–24):2703–2712.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2012.0707>
28. Deb S, Mandegar R, Di Silvio L, 2010, A porous scaffold for bone tissue engineering/45S5 bioglass derived porous scaffolds for co-culturing osteoblasts and endothelial cells. *J Mater Sci Mater Med*, 21(3):893–905.
<https://doi.org/10.1007/s10856-009-3936-5>
29. Stähli C, James-Bhasin M, Hoppe A, *et al.*, 2015, Effect of ion release from Cu-doped 45S5 bioglass(R) on 3D endothelial cell morphogenesis. *Acta Biomater*, 19:15–22.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.03.009>
30. Eldesoqi K, Seebach C, Nguyen Ngoc C, *et al.*, 2013, High calcium bioglass enhances differentiation and survival of endothelial progenitor cells, inducing early vascularization in critical size bone defects. *PLoS One*, 8(11):e79058.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079058>
31. Barbeck M, Serra T, Booms P, *et al.*, 2017, Analysis of the in vitro degradation and the in vivo tissue response to bi-layered 3D-printed scaffolds combining PLA and biphasic PLA/bioglass components—Guidance of the inflammatory response as basis for osteochondral regeneration. *Bioact Mater*, 2(4):208–223.
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.06.001>
32. Livak KJ, Schmittgen TD, 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods*, 25(4):402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
33. Carpentier G, Berndt S, Ferratge S, *et al.*, 2020, Angiogenesis analyzer for ImageJ—A comparative morphometric analysis of “Endothelial Tube Formation Assay” and “Fibrin Bead Assay”. *Sci Rep*, 10(1):11568.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-67289-8>
34. Buhr CR, Wiesmann N, Tanner RC, *et al.*, 2020, The chorioallantoic membrane assay in nanotoxicological research—An alternative for in vivo experimentation. *Nanomaterials (Basel)*, 10(12).
<https://doi.org/10.3390/nano10122328>
35. Ribatti D, Annese T, Tamma R, 2020, The use of the chick embryo CAM assay in the study of angiogenic activity of biomaterials. *Microvasc Res*, 131:104026.
<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2020.104026>
36. Yu Y, Yang B, Tian D, *et al.*, 2022, Thiolated hyaluronic acid/silk fibroin dual-network hydrogel incorporated with bioglass nanoparticles for wound healing. *Carbohydr Polym*, 288:119334.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119334>

37. Wu Z, He D, Li H, 2021, Bioglass enhances the production of exosomes and improves their capability of promoting vascularization. *Bioact Mater*, 6(3):823–835.
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.09.011>
38. El-Gendy R, Kirkham J, Newby PJ, *et al.*, 2015, Investigating the vascularization of tissue-engineered bone constructs using dental pulp cells and 45S5 bioglass(R) scaffolds. *Tissue Eng Part A*, 21(13–14):2034–2043.
<https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0485>
39. El-Gendy R, Yang XB, Newby PJ, *et al.*, 2013, Osteogenic differentiation of human dental pulp stromal cells on 45S5 bioglass(R) based scaffolds in vitro and in vivo. *Tissue Eng Part A*, 19(5–6):707–715.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2012.0112>
40. Ponce ML, 2009, Tube formation: An in vitro Matrigel angiogenesis assay. *Methods Mol Biol*, 467:183–188.
https://doi.org/10.1007/978-1-59745-241-0_10
41. Benton G, Arnaoutova I, George J, *et al.*, 2014, Matrigel: From discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv Drug Deliv Rev*, 79–80:3–18.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.06.005>
42. Fischer D, Fluegen G, Garcia P, *et al.*, 2022, The CAM model-Q&A with experts. *Cancers (Basel)*, 15(1).
<https://doi.org/10.3390/cancers15010191>
43. Weber J, Weber M, Steinle H, *et al.*, 2021, An alternative in vivo model to evaluate pluripotency of patient-specific iPSCs. *ALTEX*, 38(3):442–450.
<https://doi.org/10.14573/altex.2005221>
44. Ribatti D, 2014, The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. *Exp Cell Res*, 328(2):314–324.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.06.010>
45. Hagedorn M, Balke M, Schmidt A, *et al.*, 2004, VEGF coordinates interaction of pericytes and endothelial cells during vasculogenesis and experimental angiogenesis. *Dev Dyn*, 230(1):23–33.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.20020>
46. Cohrs NH, Schulz-Schönhagen K, Mohn D, *et al.*, 2019, Modification of silicone elastomers with bioglass 45S5(R) increases in ovo tissue biointegration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 107(4):1180–1188.
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.34211>
47. Vargas GE, Mesones RV, Bretcanu O, *et al.*, 2009, Biocompatibility and bone mineralization potential of 45S5 bioglass-derived glass-ceramic scaffolds in chick embryos. *Acta Biomater*, 5(1):374–380.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.07.016>
48. Mangir N, Dikici S, Claeysens F, *et al.*, 2019, Using ex ovo chick chorioallantoic membrane (CAM) assay to evaluate the biocompatibility and angiogenic response to biomaterials. *ACS Biomater Sci Eng*, 5(7):3190–3200.
<https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.9b00172>
49. Baiguera S, Macchiarini P, Ribatti D, 2012, Chorioallantoic membrane for in vivo investigation of tissue-engineered construct biocompatibility. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 100(5):1425–1434.
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.32653>
50. Brezulier D, Chaigneau L, Jeanne S, *et al.*, 2021, The challenge of 3D bioprinting of composite natural polymers PLA/bioglass: Trends and benefits in cleft palate surgery. *Biomedicines*, 9(11).
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9111553>
51. Kasten P, Beyen I, Niemeyer P, *et al.*, 2008, Porosity and pore size of beta-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: An in vitro and in vivo study. *Acta Biomater*, 4(6):1904–1915.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.05.017>
52. Hoemann CD, Rodriguez Gonzalez J, Guzman-Morales J, *et al.*, 2022, Chitosan coatings with distinct innate immune bioactivities differentially stimulate angiogenesis, osteogenesis and chondrogenesis in poly-caprolactone scaffolds with controlled interconnecting pore size. *Bioact Mater*, 10:430–442.
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.09.012>
53. Zhang J, Tong D, Song H, *et al.*, 2022, Osteoimmunity-regulating biomimetically hierarchical scaffold for augmented bone regeneration. *Adv Mater*, 34(36):e2202044.
<https://doi.org/10.1002/adma.202202044>
54. Finotti PF, Costa LC, Capote TS, *et al.*, 2017, Immiscible poly(lactic acid)/poly(epsilon-caprolactone) for temporary implants: Compatibility and cytotoxicity. *J Mech Behav Biomed Mater*, 68:155–162.
<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.01.050>
55. Diomedede F, Gugliandolo A, Cardelli P, *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 Res Ther*, 9(1):104.
<https://doi.org/10.1186/s13287-018-0850-0>
56. Carvalho JRG, Conde G, Antoniolli ML, *et al.*, 2021, Long-term evaluation of poly(lactic acid) (PLA) implants in a horse: An experimental pilot study. *Molecules*, 26(23).
<https://doi.org/10.3390/molecules26237224>
57. Fernandes HR, Gaddam A, Rebelo A, *et al.*, 2018, Bioactive glasses and glass-ceramics for healthcare applications in bone regeneration and tissue engineering. *Materials (Basel)*, 11(12).
<https://doi.org/10.3390/ma11122530>

58. Hoppe A, Guldal NS, Boccaccini AR, 2011, A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*, 32(11):2757–2774.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.004>
59. Zhou P, Garcia BL, Kotsakis GA, 2022, Comparison of antibacterial and antibiofilm activity of bioactive glass compounds S53P4 and 45S5. *BMC Microbiol*, 22(1):212.
<https://doi.org/10.1186/s12866-022-02617-8>

11 Danksagung

Diese Arbeit wurde am Zentrum für Orthopädie und Unfallchirurgie der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

Mein Dank gilt allen, die an dieser Arbeit beteiligt waren und mich unterstützt haben.

Besonders gilt mein Dank meiner Betreuerin für die hervorragende Zusammenarbeit und Betreuung dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die stetige Unterstützung im Laufe dieser Doktorarbeit bedanken.

12 Tabellarischer Lebenslauf