

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Chirurgie
Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Direktor: Prof. Dr. Ingo Marzi

**Entwicklung und Realisierung neuer Designs zur Nutzung als
Knochenersatzmaterial mittels Fused-Deposition-Modelling-3D-
Druck**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Jonas Neijhoft

aus Kaiserslautern

Frankfurt am Main, 2020

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Chirurgie
Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Direktor: Prof. Dr. Ingo Marzi

**Entwicklung und Realisierung neuer Designs zur Nutzung als
Knochenersatzmaterial mittels Fused-Deposition-Modelling-3D-
Druck**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Jonas Neijhoft

aus Kaiserslautern

Frankfurt am Main, 2020

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Dirk Henrich
Korreferent:	Prof. Dr. Dr. Dr. Robert Sader
Tag der mündlichen Prüfung:	13.04.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Knochenaufbau.....	1
1.2 Frakturheilung	2
1.2.1 Primäre Frakturheilung	2
1.2.2 Sekundäre Frakturheilung.....	3
1.2.3 Pseudarthrose.....	4
1.3 Therapie langstreckiger Knochendefekte.....	6
1.3.1 Goldstandard	6
1.3.2 Knochenersatzmaterialien	7
1.4 Das ideale Scaffold	11
1.5 Technologie 3D-Druck	13
1.6 Ziele dieser Arbeit	17
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Materialien: Entwicklung und 3D-Druck	19
2.1.1 Drucker	19
2.1.2 Filamente	19
2.1.3 Druckeraufrüstung	19
2.1.4 Druckprozess - Software.....	20
2.1.5 Mechanikversuche	21

2.2	Materialien: Laborversuche	21
2.2.1	Geräte	21
2.2.2	Verbrauchsmaterial	22
2.2.3	Zellen	23
2.2.4	Substanzen und Lösungen	23
2.2.5	Software für Auswertungen und Zeichnungen	26
2.3	Methoden	26
2.3.1	Entwicklung der Knochenersatzdesigns	26
2.3.2	Realisierung der Scaffolds	27
2.3.3	Mediumherstellung	30
2.3.4	Kultivierung der Saos-2-Zellen	31
2.3.5	Desinfektionstest	32
2.3.6	Erstellen eines Beschichtungsprotokolls	32
2.3.7	Aussaat und Zelladhäsion von Saos-2-Zellen auf Scaffolds	33
2.3.8	Zellaktivität	35
2.3.9	Osteogene Differenzierung	35
2.3.10	Mechanische Evaluation	39
2.3.11	Statistik	42
2.3.12	Erstellung von Grafiken und Abbildungen	42
3	Ergebnisse	44
3.1	Entwicklung der Scaffolds	44
3.1.1	Designhierarchie	44
3.1.2	Basisparameter der Designstudien	46
3.1.3	Druckparameter und Realisierung	49
3.1.4	Designstudie Raster	50
3.1.5	Designstudie Tempel	51
3.1.6	Designstudie Zwiebel	53

3.1.7	Entwicklung Baukastensystem und Funktionsadapter	55
3.2	Desinfektion	58
3.3	Zelladhäsion.....	59
3.4	Zellaktivität	63
3.5	Osteogene Differenzierung	64
3.5.1	Zellaktivität unter Osteogener Differenzierung.....	64
3.5.2	Alizarin-Rot-Färbung.....	64
3.5.3	Genexpressionsanalyse.....	66
3.6	Mechanische Evaluation	67
4	Diskussion.....	70
4.1	Designentwicklung	70
4.1.1	Makrostruktur.....	71
4.1.2	Mikrostruktur	72
4.1.3	Designstudie Raster.....	74
4.1.4	Designstudie Tempel	75
4.1.5	Designstudie Zwiebel.....	76
4.1.6	Baukastensystem und Funktionsadapter	77
4.1.7	Ausgangssubstanz Polylaktat.....	79
4.1.8	Technologie 3D-Druck	80
4.2	Desinfektion	81
4.3	Zelladhäsion und Zellaktivität.....	82
4.4	Osteogene Differenzierung	84
4.5	Mechanische Evaluation	86
4.6	Ausblick.....	88
5	Zusammenfassung.....	89
6	Summary.....	90
7	References.....	92

8	Anhang.....	107
9	Curriculum Vitae.....	111
10	Danksagung	113
11	Schriftliche Erklärung.....	114

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Knochenersatzmaterialien im Überblick	8
Abbildung 2: Aufbau eines <i>Extruders</i>	15
Abbildung 3: Portaldrucker mit Freiheitsgraden im Raum	16
Abbildung 4: G-Code Erläuterung	17
Abbildung 5: Bettadhäsionstypen	30
Abbildung 6: Mechanischer Teststand	40
Abbildung 7: Schaltplan / Fritzing des Messstandes	41
Abbildung 8: Designhierarchie.....	45
Abbildung 9: Weitere (verworfen) Designideen	46
Abbildung 10: Vollmodelle Größenrelation	47
Abbildung 11: Mikrostruktur durch den Druckprozess	48
Abbildung 12: Designstudie Raster	50
Abbildung 13: Realisiertes Raster	51
Abbildung 14: Designstudie Tempel.....	52
Abbildung 15: Realisierter Tempel	53
Abbildung 16: Designstudie Zwiebel	54
Abbildung 17: Realisierte Zwiebel	55
Abbildung 18: Adapterregion im Detail	56
Abbildung 19: Adaptersystem Bauteile.....	57
Abbildung 20: CFSE-DAPI-Färbung; Efluoreszenz	60
Abbildung 21: Adhäsion auf den Scaffolds unter dem REM.....	62
Abbildung 22: Zellaktivitätsversuch mittels des MTT-Tests.....	63
Abbildung 23: Makroskopisches Bild der MTT-Testmodelle.....	64
Abbildung 24: Alizarin-Färbung Raster.....	65
Abbildung 25: Alizarin-Färbung Tempel	65
Abbildung 26: Alizarin-Färbung Zwiebel.....	66
Abbildung 27: PCR-Auswertung nach Livak.....	67
Abbildung 28: Stauchungsstrecke, bei der es zum Versagen kommt.....	68
Abbildung 29: Modelle nach Stauchung	69
Abbildung 30: Konzeptaufbau der modularen Hierarchie	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick über die Modifikationen des 3D-Druckers	27
Tabelle 2: Bauteilhöhe und Zellzahlen auf unterschiedlichen Scaffoldtypen	34
Tabelle 3: Kultivierungsdauer der Versuche.....	36
Tabelle 4: Basisparameter der verschiedenen Designstudien	49
Tabelle 5: Basisdruckparameter.....	49
Tabelle 6: Desinfektionstest – Ermittlung der Desinfektionsdauer.....	58

Abkürzungsverzeichnis

3D	Dreidimensional
ABS	Acrylnitril-Butadien-Styrol
alp	Alkalische Phosphatase
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BREP	<i>Boundary Representation</i>
°C	Grad Celsius
CSG	<i>Constructive Solid Geometry</i>
CAD	<i>Computer-Aided Design</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COL	<i>Kollagen</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CSD	<i>Critical size defect</i>
Ct-Wert	<i>Cycle Threshold-Wert, Zyklusschwelle</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DBM	Demineralisierte Knochenmatrix
DIPS	<i>Digital Image Processing System</i>
E-Modul	Elastizitätsmodul
EPC	<i>Endothelial progenitor cell</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FDM	<i>Fused Deposition Modelling</i>
FFF	<i>Fused Filament Fabrication</i>
FR4	<i>Flame Retardant Klasse 4</i>

<i>gapdh</i>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HDT	<i>Heat Distortion Temperature</i>
ISO	Internationale Standard Organisation
Mefp-1	<i>Mytilus edulis foot protein-1</i>
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cells</i>
MTT	Methyl-thiazolyl-tetrazolium
NiRo	Nichtrostender Stahl
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCL	Polycaprolacton
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
PETG	Glykol modifiziertes Polyethylenterephthalat
PEEK	Polyetheretherketon
PLA	Polylactat
PMMA	Polymeres Methyl-Methacrylat
PTFE	Polytetrafluorethylen, Teflon
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RepRap	<i>Replicating Rapid Prototyper</i>
RIA	Reamer-Irrigator-Aspirator
RLT	Lysis-Puffer
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT	Reverse Transkriptase
SLA	<i>Stereolithography</i>
STL	<i>Standard Triangulation Language</i> (Dateiformat)

SLM	<i>Selective Laser Melting</i>
TCP	Tricalciumphosphat
U/min	Umdrehungen pro Minute
UHMWPE	<i>Ultra-high-molecular-weight-polyethylene</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

1 Einleitung

1.1 Knochenaufbau

Röhrenknochen von Säugetieren folgen üblicherweise einem charakteristischen Aufbau. Um eine innenliegende poröse Schicht, Spongiosa genannt, liegt eine kompakte Schicht, die Kortikalis oder Kompakta. Die Spongiosa besteht aus einem Geflecht aus Knochenbälkchen, welche Kanäle und Poren mit einer Porosität von 50-90 % bilden. Im Innern befindet sich das Knochenmark. Die äußere, rindenartige und mit einer Porosität von 10 % deutlich kompaktere Kortikalis besteht aus den ringförmig angeordneten Untereinheiten der Osteone. Diese verlaufen in axialer Richtung des Knochens und stehen über die orthogonal zur Knochenachse verlaufenden Volkmann-Kanälen untereinander in Kontakt. Im Zentrum eines Osteons befindet sich der Havers-Kanal, der jeweils ein zentrales Gefäßbündel aus Vene und Arterie beinhaltet. Eine bindegewebige Haut zur Nährstoff- und Sauerstoffversorgung bildet das Periost, das dem Knochen von außen anliegt. Es dient außerdem als Bindeglied zwischen dem umliegenden Muskelgewebe und der Knochenmatrix.¹ Im Innern ist der Knochen mit einer dünnen Schicht, dem Endost, ausgekleidet.

Knochen sind gut vaskularisierte Organe. So fallen 10-20 % des Herzzeitvolumens auf die Durchblutung des Knochens, die in den verschiedenen Regionen unterschiedlich gewährleistet wird²: Die Diaphysen langer Röhrenknochen besitzen ein zweifach organisiertes Gefäßsystem. Die Versorgung geschieht in den inneren zwei Drittel vor allem durch zentrale medulläre Gefäße. Das äußere Drittel hingegen wird durch eine oder wenige periphere periostale *Aa. nutriciae*, die durch *Canales nutricii* in den Knochen eintreten, durchblutet¹. Die größeren Gefäße verzweigen sich im Innern zu einem dichten Gefäß- und Kapillarnetz. Beide Systeme verfügen über eine gute Anastomosierung. Berggren et al. stellten 1982 ein Konzept vor, das das dynamische Zusammenspiel beider Systeme beschreibt. So kann es durch Blockade oder Widerstandserhöhung in einem der Systeme zur Flussumkehr kommen. Geschieht dies, wird es dann durch das jeweilig andere System mitversorgt und die Durchblutung kann aufrechterhalten werden.³ Die Epiphysen und die spongiöse Metaphyse werden von wenigen starken Gefäßen versorgt. Zusätzlich sorgen zahlreiche feine Arterien für die weitere Versorgung der restlichen Metaphyse. Auch diese Systeme sind durch eine hohe

Anastomisierung gekennzeichnet und im Falle des ausgewachsenen Knochens nur schwer voneinander zu trennen.⁴

Zeitlebens unterliegt der Knochen stetigen Umbauprozessen. Der Knochenaufbau wird vor allem von den Osteoblasten, der Abbau vorrangig von den Osteoklasten getragen. Die Osteoblasten bilden zunächst eine unmineralisierte Knochensubstanz aus Kollagen. Dieses wird im Anschluss langsam durch Einbau und Mineralisation mit Hydroxyapatit in eine feste Matrix umgewandelt.⁵ Liegen die Osteoblasten dann zentral eingebettet in einer ringförmigen Struktur, dem Osteon, so werden sie Osteozyten genannt. Diese Osteozyten kommunizieren untereinander über *gap junctions* an ihren Fortsätzen.⁶ Alternativ befinden sich die Osteoblasten ruhend an der Oberfläche und können von hier reaktiviert werden. Das Verhältnis zwischen Auf- und Abbau, die sogenannte Knochenbilanz, verschiebt sich im Laufe des Lebens. Im Kindesalter überwiegen die Aufbauprozesse, die sich im Erwachsenenalter mit dem Abbau equilibrieren. Im Senium hingegen überwiegt der Abbau.⁷

1.2 Frakturheilung

Das Wort Fraktur hat seinen Ursprung im lateinischen Verb *frangere* und bedeutet brechen. Eine Fraktur beschreibt den Zustand der Kontinuitätsunterbrechung eines Knochens unter Bildung von zwei oder mehr Fragmenten durch direkte oder indirekte Krafteinwirkung.

1.2.1 Primäre Frakturheilung

Stehen die Fraktarenden unter Kompression in direktem Kontakt zueinander, besteht eine ausreichende Durchblutung sämtlicher Fragmente und sind diese ruhiggestellt, kommt es zur primären bzw. direkten Knochenheilung. Durch appositionelles Fortwachsen der Osteone in das gegenüberliegende Fragment werden die Knochenenden durch ein verknöcherndes Geflecht ähnlich dem Verzinken einer Schublade miteinander verzahnt. Dieser Vorgang läuft ohne Bildung eines Narbengewebes ab, das im Falle des Knochens Kallus genannt wird.^{1,8} Der

Endpunkt der primären Knochenheilung ist die vollständige und funktionale Heilung, *Restitutio ad integrum* genannt.

1.2.2 Sekundäre Frakturheilung

Häufig sind die erwähnten Voraussetzungen (Kompression, Durchblutung, Ruhigstellung) jedoch nicht erfüllt und es kommt zur sekundären bzw. indirekten Frakturheilung. Knochen ist Scharf et al. (2009) zufolge als einziges Organ dazu in der Lage, über den Schritt der Kallusbildung nach vollständiger Unterbrechung der Kontinuität „organotypisch zu regenerieren“.⁸ Die indirekte Heilung kann in verschiedene Phasen unterteilt werden:

In der Verletzungsphase entsteht aufgrund durchtrennter periostaler und medullärer Gefäße durch die einwirkende Kraft zunächst ein Hämatom. Das Hämatom durchdringt den Frakturspalt und die nahe Umgebung. Auf diesem Weg werden Wachstumsfaktoren freigesetzt sowie multipotente Zellen verteilt und aktiviert.⁹

Die darauffolgende inflammatorische Phase ist durch die Infiltration von Zellen wie Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten geprägt.¹⁰ Diese halten die durch Detritus und Endothelschäden initiierte Entzündungsreaktion mittels verschiedener Zytokine und Histamin aufrecht. Die ebenfalls im Frakturhämatom befindlichen mesenchymalen multipotenten Progenitorzellen entwickeln sich zu den späteren Akteuren wie Osteoblasten, Fibroblasten und Chondroblasten. Sie sind unter anderem an der Bildung eines bindegewebigen Kallus beteiligt, welcher durch minimale Bewegungen der Frakturrenden gegeneinander gefördert wird.

Im nächsten Schritt, der Granulationsphase, wird das Hämatom und dessen Geflecht aus Fibrin und Kollagen durch Fibroblasten in ein Netz aus Granulationsgewebe umgewandelt. Vor allem in den zentralen Bereichen des Frakturhämatoms herrschen weiterhin hypoxische Bedingungen. Es kommt zur chondrogenen Ausdifferenzierung eines Teiles der Progenitorzellen. Diese Chondroblasten bilden dann im Rahmen der enchondralen Ossifikation zunächst einen Faserknorpel.¹¹ Es entsteht ein weicher bzw. fibrocartilaginärer Kallus, der von beiden Enden des Frakturspalt nach außen sowie aufeinander zuwächst. Die Osteoklasten beginnen mit dem Abbau avitalen Knochens, die Osteoblasten mit dem vom

Periost ausgehenden Aufbau des neuen Knochens.¹² Dieser Vorgang nennt sich primäre Kallusreaktion.⁸

Um den mechanischen Anforderungen wieder gerecht zu werden, muss dieser weiche Kallus in der Phase der Kallushärtung verfestigt werden. Dies geschieht durch den Einbau von Knochenmineralen wie Hydroxylapatit in die Kollagenfasern von den angelagerten Osteoblasten. Hierdurch entsteht zunächst der unreife Geflechtknochen.^{8,11,13} Dessen innere Ausrichtung folgt noch nicht den natürlichen Krafttrajektorien, sondern orientiert sich entlang der zuvor gebildeten Kapillaren. Demnach ist dieser Knochen noch nicht optimal darauf ausgelegt, den ursprünglichen Belastungen entgegenzuwirken.

In der letzten Phase, dem Remodelling, wird dieser Geflechtknochen in einem Zusammenspiel aus Osteoblasten und -klasten allmählich in reifen Lamellenknochen umgewandelt.¹⁴ Dessen Ausrichtung orientiert sich entlang der ursprünglichen Druck- und Zugtrajektorien. Die ehemaligen Frakturbereiche nähern sich der vorherigen physiologischen Struktur an. Es kommt weiterhin zur Ausbildung von Havers- und Volkmannkanälen und des endgültigen Vaskularisierungssystems.^{8,11,14} Der Kallus wird langsam resorbiert.¹⁴ Auch bei der sekundären Frakturheilung ist der Endpunkt demnach die Wiederherstellung der ursprünglichen Kontinuität und Funktion.

1.2.3 Pseudarthrose

Definiert werden kann der Zustand ausbleibender Kontinuitätswiederherstellung anhand von zeitlichen Aspekten. Unterschieden wird zwischen verzögerter Frakturheilung nach 4-6 Monaten und der Pseudarthrose, dem falschen Gelenk, nach 6-8 Monaten ausbleibender Heilung.¹⁵ Ohne Therapie kann es zu der Maximalform eines falschen Gelenkes mit Knorpelüberzug und einer Kapsel kommen.

Im Folgenden sind Einflussfaktoren für die Ausbildung einer Pseudarthrose dargestellt:

Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Pseudarthrose steigt unter anderem mit der zu überbrückenden Defektdistanz. Eine große Defektdistanz resultiert zum Beispiel aus ausgedehnten Traumata oder Tumorsektionen. Über

eine exakte Definition der Länge, ab dem ein Knochendefekt als kritisch angesehen wird, gibt es keinen Konsensus. Überschreitet die Defektlänge den 2- bis 2,5-fachen Durchmesser des Knochens, muss jedoch mit einer ausbleibenden Heilung gerechnet werden.^{16,17} Weiterhin besteht eine Korrelation zwischen einer großen Defektdistanz und der Dauer des Heilungsprozesses.¹⁸

Die Länge ist nicht die einzige Variable, die eine negative Wirkung auf die Knochenheilung haben kann. So spielen zum Beispiel das Alter des Patienten, die Lokalisation und Durchblutungssituation, Infektion oder umliegende Weichteilschäden eine wichtige Rolle.^{11,18} Dies wird bei der ursächlichen sowie morphologischen Unterteilung der Pseudarthrose-Formen deutlich:

Die Form der hypertrophen, reaktiven oder auch vitalen Pseudarthrose zeichnet sich durch eine überschießende Regeneration aus. Es finden sich aufgetriebene Frakturenenden, die radiologisch elefantenfußartig imponieren. Ursache können die ungenügende Ruhigstellung des Frakturspalts, eine zu große Defektdistanz oder im Frakturspalt einliegendes Fremdgewebe wie beispielsweise Muskel sein.¹⁵ Ungenügende Ruhigstellung führt im Randbereich der Frakturenenden zu stärkerer Kallusbildung, kann im Frakturspalt jedoch eine vermehrte Bindegewebsbildung bedingen.¹⁸ Dennoch muss auch beachtet werden, dass minimale interfragmentäre Verschiebungen durch Kompression die Knochenheilung positiv beeinflussen können.^{18,19} Die Knochenenden dieser Pseudarthrose-Form sind vital und hypervaskularisiert. Therapeutisch steht das Ausräumen des Fremdgewebes und die mechanische Fixierung der Knochenenden im Vordergrund.¹⁵

Dem gegenüberzustellen ist die atrophische oder avitale Pseudarthrose. Es kommt zu einem Ausbleiben der physiologischen Heilung aufgrund mangelnder Blut- und damit Nährstoffversorgung. Dies kann zum Beispiel bei sehr schweren Knochen- und Weichteilschäden der Fall sein. Ziel der Therapie sind Resektion avitalen Gewebes und Wiederherstellung aktiver - und damit reaktionsfähiger - Knochenenden. Bei zu großer Defektdistanz muss erneut mit dem Ausbleiben einer Heilung gerechnet werden und es kann ein Auffüllen, zum Beispiel mit körpereigener Spongiosa, wie im folgenden Kapitel beschrieben, nötig sein.¹⁵

1.3 Therapie langstreckiger Knochendefekte

1.3.1 Goldstandard

Eine Pseudarthrose kann Ursache und Folge eines langstreckigen kritischen Knochendefekts (CSD, engl. *critical size defect*) sein. Ihre Therapie stellt eine große Herausforderung im Bereich der rekonstruktiven Chirurgie dar.²⁰

Das therapeutische Ziel besteht darin, den entstandenen Knochendefekt aufzufüllen. Der aktuelle Goldstandard hierfür ist die autologe Spongiosaplastik: Es wird im Bereich des Beckenkamms Spongiosa entnommen, welche dann in den Knochendefekt implantiert wird. Zur Spongiosagewinnung ist jedoch ein weiterer Eingriff notwendig. Typische Risiken der autologen Beckenkammtransplantation sind neben Schmerzen die begrenzte Verfügbarkeit und eventuelle Komorbiditäten im Bereich der Entnahmestelle. Direkte Verletzungen während des Eingriffs oder indirekte Verletzungen durch Kompression aufgrund eines Hämatoms können weiterhin Nerven oder Gefäße schädigen.⁸

Eine vielversprechende Alternative ist das Reamer-Irrigator-Aspirator-Verfahren (RIA-Verfahren) mit intramedullärer Gewinnung von Spongiosa durch Aufbohren des Markraums eines Röhrenknochens.²¹⁻²³ Die so entnommene Suspension aus Blut, Zellbestandteilen und Spongiosa-Granulat wird im Anschluss in den Knochendefekt implantiert.²⁴ Neben der lokalen Wundinfektion sind beim RIA-Verfahren weitere Komplikationen zu nennen. Hierzu zählen peri- sowie postoperative Frakturen im Bereich der Entnahmestelle, die kortikale Perforation²⁴⁻²⁷ oder der Verbleib der Spülreibahle im Markraum des Patienten bei Materialbruch.²⁸ Außerdem wird der Verbleib durch die pastöse Grundkonsistenz des Spendermaterials im Knochendefekt nur durch die umliegende Muskelfaszie gesichert.

1.3.2 Knochenersatzmaterialien

Beschäftigt man sich mit dem Thema Knochenersatz, gilt es zunächst einige biologische Grundbegriffe zu erläutern:

a) Osteokonduktivität

Osteokonduktivität beschreibt die Eigenschaft, dem natürlichen Knochenwachstum ein Leitgerüst zu bieten sowie durch Poren und Kanälen eine Wachstumsrichtung vorzugeben. Diese Poren gewährleisten auch das Zellüberleben, das maßgeblich durch die ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung über Diffusion bestimmt wird. Sie dienen auch als erste Eintrittspunkte für Gefäße im Rahmen der späteren Neovaskularisation.²⁹ Geometrische Basisparameter für Porendurchmesser sind in Abschnitt 1.4 erläutert. Das Zellwachstum wird ebenfalls durch den Faktor Biokompatibilität bestimmt. Auch wenn Normen und Standardisierungen wie die EN ISO 10993-1 „Biologische Beurteilung von Medizinprodukten“ Biokompatibilität thematisieren³⁰, besteht Williams (2008) zufolge, keine exakte Definition des Begriffs.³¹ Statt der oft verwendeten „*list of negatives*“³¹ (Non-Toxizität, Non-Immunogenität und geringe Fremdkörperreaktion³¹⁻³³), schlägt er eine funktionsbezogene Definition vor: Das Biomaterial soll keine unerwünschten „*local or systemic effects in the host*“, also lokale oder systemische Entzündungsreaktionen, hervorrufen, gleichzeitig aber für eine dem Einsatzgebiet angepassten Zell- und Gewebeantwort sorgen.³¹

b) Osteoinduktivität

Ein Scaffold wirkt osteoinduktiv, wenn es das Einwandern von multipotenten Stammzellen und deren Differenzierung zu osteogenen Zelllinien wie Osteoblasten fördert.^{29,34} Diese bilden anschließend im Schritt der Osteogenese neuen Knochen, dessen Wachstum nicht zwingend von den Frakturrenden ausgeht, sondern durch Einwandern der Zellen auch *de novo* auf dem Knochenersatzmaterial stattfinden kann.

c) Osteogenese

Bietet das Knochenersatzmaterial den Zellen ideale osteokonduktive sowie osteoinduktive Bedingungen, kommt es nach Einwanderung knochenbildender Zellen entlang des vorgegebenen Gerüsts zu einer Ossifikation des Knochenersatzes und der Defektzone.³⁴

In Abschnitt 1.3.1 wurden bereits zwei biologisch autogene Knochenersatz-Verfahren beschrieben. Eine graphische Übersicht unterschiedlicher Knochenersatzmaterialien zeigt Abbildung 1.

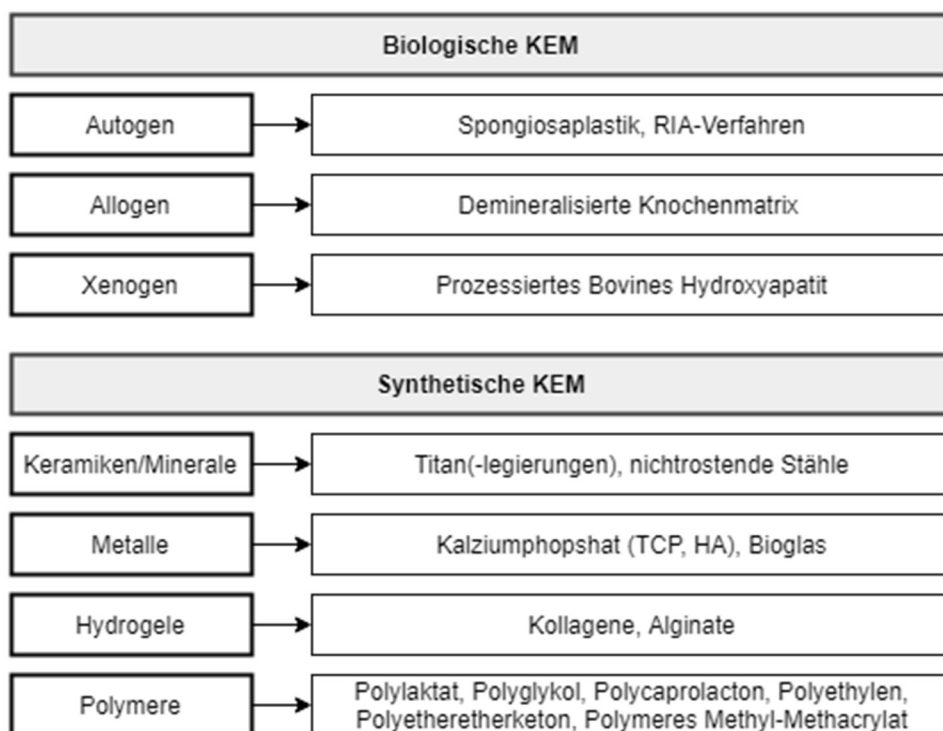


Abbildung 1: Knochenersatzmaterialien im Überblick

1.3.2.1 Biologische Knochenersatzmaterialien

Eine Differenzierung erfolgt in autogene, allogene und xenogene Knochenersatzmaterialien.³⁵ Autolog biologische Ersatzverfahren sind zum Beispiel die bereits in Abschnitt 1.3.1 erläuterte Spongiosaplastik oder das RIA-Verfahren.

Zum allogenen Ersatz gehören das prozessierte humane Spongiosa Allograft und die demineralisierte Knochenmatrix (DBM). Hier werden während der

Prozessierung und Sterilisation sämtliche Zellen entfernt und, im Falle der DBM, der Knochen demineralisiert. Die Verträglichkeit wird gesteigert und im Gegensatz zu anderen Allografts bleiben osteoinduktive Eigenschaften, wenn auch in geringerem Maße als bei autogenem Ersatz, erhalten.^{36,37} Eine mechanisch rigide Verankerung ist jedoch nicht möglich.^{38,39} Allografts zeichnen sich sowohl durch ihre gute Verfügbarkeit in unterschiedlicher Form und Größe, als auch ihre einfache Anwendung aus. Ein Nachteil der Allografts besteht jedoch in dem minimalen Restrisiko einer Infektionsübertragung.^{34,40} Sohn et al. (2019) zufolge, sind zwei Fälle der HIV-Übertragung beschrieben.^{34,41,42} Weiter gibt es zu Allografts einzelne *Case-Reports* der Übertragung mit HBV, HCV und *Clostridium difficile*.^{34,43-45}

Die Resorptionskinetik stellt einen weiteren Nachteil der Allografts dar, denn Teile des avitalen Knochengerstes können noch über Jahre im Knochen verbleiben. Dadurch verhindern diese Reste eine dortige Heilung mit mechanischer *Restitutio ad integrum*.^{46,47} Es kann zu Mikro- aber auch zu Makrofrakturen kommen, die wiederum die Stabilität des Knochens beeinflussen können.

Xenogene Ersatzmaterialien sind speziesfremden Ursprungs. Hierzu gehören zum Beispiel das prozessierte bovine Hydroxyapatit. Aufgrund der artfremden Verwendung ist die Verträglichkeit jedoch reduziert und es besteht ebenfalls ein Infektionsrisiko.⁴⁸

1.3.2.2 Synthetische Knochenersatzmaterialien

Es ist eine Fülle synthetischer Knochenersatzstoffe vorhanden. Generell bieten diese Ersatzmaterialien den Vorteil der unbegrenzten Verfügbarkeit sowie des fehlenden Infektionsrisikos.⁴⁹

Metalle wie Titan oder nichtrostender Stahl (NiRo) sind aus dem klinischen Alltag zur Überbrückung und Fixierung von Frakturen oder als Gelenkersatz nicht mehr wegzudenken. Sie weisen eine geringe Fremdkörperreaktion auf. Es kann jedoch zu allergischen Reaktionen auf Abriebsbestandteile kommen. Sie sind also nicht vollständig biologisch inert.^{50,51} Ein chemisch stabiles Einwachsen findet nicht statt. Hierzu ist eine Beschichtung der Metalloberfläche, z.B. mit Hydroxyapatit notwendig. Auch eine Texturierung der Oberfläche führt zu einer langfristig stabileren Verankerung im Knochen. Da die Metalle nicht resorbiert werden, können

sie nicht durch Knochen ersetzt werden. Daher müssen sie lokalisationsabhängig wieder entfernt werden. Gerade bei Metall-auf-Metall-Verbindungen, wie es bei manchen Gelenkprothesentypen der Fall ist, können durch Abrieb Ionen wie Kobalt und Chrom in den systemischen Kreislauf gelangen oder dort abgelagert werden. Diese können in höheren Dosen toxisch wirken.^{50,52,53}

Knochenähnliche Calcium-Mineralen und Keramiken wie Phosphatverbindungen, Silikate oder Bioglas bilden eine große Gruppe unterschiedlicher Substanzen. Viele Keramiken sind hoch inert und eignen sich daher für Anwendungen, bei denen keine Reaktion des Körpers gewünscht ist. Biogläser hingegen zeichnen sich durch ihre gute Biokompatibilität⁵⁴ und Bioaktivität^{55,56} aus. Es resultiert eine positive Wirkung auf die Verankerung im Knochendefekt. Biogläser bestehen aus einer Mischung aus Siliziumdioxid, Calciumoxid, Natriumoxid und Diphosphor-pentoxid, wobei die Mengenverhältnisse je nach Formulierung variieren. Calciumphosphate wie Tricalciumphosphat (TCP) oder Hydroxyapatit (HA) kommen der Zusammensetzung natürlichen Knochens sehr nahe. Diese Substanzen unterliegen einer zügigen Resorption und bieten nur geringe mechanische Stabilität.⁵⁶ Durch Mischungen der oben genannten Substanzen mit Proteinen wie *bone morphogenetic proteins* (BMP), *vascular endothelial growth factors* (VEGF) oder rekombinanten Wachstumsfaktoren verbessern sich Osteoinduktivität und Angiogenese.^{34,38,57-59}

Es gibt eine Vielzahl weiterer synthetischer Substanzklassen wie Zemente oder Hydrogele. Eine für das Vorhaben des 3D-Druckens interessante Klasse sind die thermoplastischen Polymere. Hierzu gehören beispielsweise Polylaktat (PLA), Polyglykol (PEG), Polycaprolacton (PCL) oder Polyetheretherketon (PEEK). Zwei weitere wichtige Vertreter dieser Polymere sind das polymere Methyl-Methacrylat (PMMA), bekannt als Knochenzement⁶⁰, oder *Ultra-high-molecular-weight-polyethylene* (UHMWPE), das in Form von Gelenk-Inlays zum Einsatz kommt.⁶¹ Ein wichtiger Vorteil dieser Polymere ist deren Eigenschaft bei einer bestimmten Temperatur plastisch formbar zu sein.⁶²⁻⁶⁴ Dies macht sie mittels additiver Fertigungstechnik einfach zu verarbeiten.

Da viele der teilweise bereits kommerziell erhältlichen Knochenersatzmaterialien in Granulat- oder Faserform vorliegen, ist das dauerhafte Einbringen durch deren

fehlende mechanische Integrität problematisch.⁶⁵ Eine feste Verankerung in den Knochenenden sowie zwischen den einzelnen Granulatstücken ist durch Kompression kaum möglich. Die thermoplastischen Polymere hingegen sind an den Knochendefekt anpassbar und mechanisch stabil, was bereits *in vitro*⁶⁶, im Kleintier-^{54,67} sowie im Großtiermodell⁶⁸ gezeigt werden konnte. Speziell die Poly-laktide werden in Form von Schrauben und Miniplatten schon im klinischen Alltag, z.B. in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie verwendet.⁶⁹ Auf Basis dieses formbaren alloplastischen Knochenersatzmaterials besteht das Interesse ein Design zu entwickeln, das funktionelle Untereinheiten mit einer der Knochenheilung förderlichen Mikrostruktur in einer mechanisch stabilen Makrostruktur vereint.⁷⁰

1.4 Das ideale Scaffold

In der Entwicklung des idealen Scaffolds setzt das Knochen-*Tissue-Engineering* als vielversprechende Alternative zum bisherigen Goldstandard an.^{71,72} Es kombiniert körpereigene, knochenregenerative Zellen mit einem dreidimensionalen Gerüststoff. Zu diesen Zellen gehören z.B. endotheliale Progenitorzellen (EPC) und mesenchymale Stromazellen (MSC). EPC und deren Subgruppen entstehen aus CD133+ hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks sowie monozytären Vorläuferzellen. Sie zirkulieren im Blut und differenzieren zu Endothelzellen aus. Damit spielen sie eine wichtige Rolle in der Vaskulogenese.⁷³⁻⁷⁶ MSC hingegen differenzieren zu verschiedenen Zelltypen des Gewebes, darunter Osteoblasten, Chondrozyten oder Adipozyten. Sie ermöglichen die Regeneration der betreffenden Gewebe.^{75,77} Insbesondere in Kombination dieser beiden Zelltypen konnten Seebach et al. (2010) eine gesteigerte Neovaskulogenese in der Defektzone zeigen.⁷⁵ Das mit Zellen besiedelte Scaffold wird anschließend in den Knochendefekt implantiert.

Folgende Anforderungen werden an ein ideales Allograft, bzw. Scaffold gestellt:^{37,78,79} Zunächst darf die Substanz und deren Abbauprodukte keine Toxizität oder Kanzerogenität aufweisen.⁷⁸ Diese würde nicht nur die lokale Wundheilung und die Ausbreitung der regenerativen Zellen auf dem Scaffold behindern, sondern im schlimmsten Fall dem gesamten Organismus schaden. Um eine mechanisch stabile Verankerung mit vollständiger Durchbauung und ein festes

Einwachsen des Scaffolds in die Frakturrenden zu erreichen, spielen die Faktoren Osteokonduktivität und -induktivität eine wichtige Rolle.^{34,56,80,81}

Da das Scaffold auch als Leitschiene für den zunächst noch sehr fragilen, neu gebildeten Knochen dient, muss es eine gewisse mechanische Stabilität bieten und diese kurzfristig auch aufrechterhalten. Die Stabilität hängt maßgeblich von der Resorptions- und Degradationskinetik des verwendeten Materials ab und ist zusätzlich durch die Geometrie variierbar.^{35,56,82} Bei optimaler Resorptionskinetik wird der Knochendefekt bis zur Ausbildung einer mechanischen Integrität durch den neu gebildeten Knochen stabilisiert und die Ausbildung eines minderwertigen fibrösen Ersatzgewebes verhindert.³⁴ Ohne zurückbleibende Residuen sollte der Knochenersatz im Anschluss bei hoher Biokompatibilität vollständig resorbiert und durch körpereigenen Knochen ersetzt werden. So wird eine *Restitutio ad integrum* erreicht und der Knochen kann seinen ursprünglichen Anforderungen wieder gerecht werden. Die während dieses Umbauprozesses anfallenden Abbauprodukte sollen dem Organismus nicht schaden und sich nicht in anderen Geweben ablagern.

Bezüglich der Geometrie spielen neben der Anpassbarkeit an Größe, Durchmesser und Länge des Knochendefekts auch die biogeometrischen Basisparameter des Knochens eine wichtige Rolle. Die Spongiosa des Knochens besteht aus einem feinen Trabekelgeflecht mit hoher Porosität. Es ist Aufgabe des *Tissue-Engineering*, diese Trabekelstruktur mit ihrer Porosität zu imitieren. Während Porendurchmesser von 300-400 µm die Osteokonduktivität verbessern, fördern Durchmesser von 140 µm die Angiogenese.⁸³⁻⁸⁵ Ebenfalls wichtig ist eine hohe Interkonnektivität zwischen den einzelnen Poren.^{85,86}

Das Knochenersatzmaterial muss natürlichen Knochen nicht nur imitieren, sondern auch optimale Bedingungen für sämtliche Phasen der Knochenheilung bieten.¹¹ Insbesondere die Frakturhämatombildung mit Zelleinwanderung und die spätere Neoangiogenese spielen eine entscheidende Rolle im Rahmen des Zellüberlebens. Bezüglich des Frakturhämatoms ist eine offenporige Grundstruktur des Scaffolds besonders wichtig. Diese verhindert das sofortige Verschließen der Zugänge zu den inneren Bereichen des Scaffolds, sodass die Zellmigration hierhin nicht behindert wird. Auch die Nährstoffversorgung kann bei einer offenen

Grundstruktur mit kurzen Diffusionswegen aufrechterhalten werden.^{11,87} Während bei kleinen Modellen diese Diffusionsstrecken noch kurz sind und die *in vitro* oder Kleinterversuche mit diesen Modellen ein positives Ergebnis zeigen, können durch das direkte Vergrößern der Scaffolds die Diffusionsstrecken so groß werden, dass die Nährstoffversorgung in die inneren Bereiche des Scaffolds nicht mehr gewährleistet wird.⁸⁸⁻⁹⁰ Stattdessen darf nicht nur die X-, Y- und Z- Dimension geändert werden, sondern es muss bei gleichbleibender Mikrostruktur auch die Anzahl der funktionellen Untereinheiten und Poren ansteigen.

Letztendlich scheint das ideale Scaffold im Knochen-*Tissue-Engineering* bei CSD noch nicht gefunden.^{29,68,91} Der 3D-Druck bietet einen Ansatz, mit dessen Hilfe vielerlei unterschiedliche Entwürfe kostengünstig hergestellt und getestet werden können. Auch wenn das Thema 3D-Druck in den letzten Jahren zunehmend an Aufmerksamkeit gewinnt, ist diese Technologie keinesfalls neu.

1.5 Technologie 3D-Druck

Die Technologie des 3D-Drucks umfasst ein weites Gebiet unterschiedlicher Verfahren, deren gemeinsamer Ursprung in den 1980er Jahren liegt. Bereits 1986 meldete der Amerikaner Charles Hull ein Patent für das Verfahren der Sterelithographie (SLA) an.⁹² Vier Jahre später wurde ein weiteres Verfahren, das Selektive Lasersintern, vorgestellt.⁹³ Im Jahr 1988 meldete die Firma Stratasys unter Scott Crump das sogenannte *Fused Deposition Modeling* (FDM) als Patent an.⁹⁴ Mit der Einführung dieser additiven Fertigungsverfahren, entwickelte sich auch die Technik des *Computer-Aided Designs* (CAD), mit dem 3D-Modelle am Computer entworfen werden konnten. Vor allem der FDM-Druck erfreute sich innerhalb des *Replicating-Rapid-Prototyper-Projektes* (RepRap) großer Beliebtheit. Die hier entwickelten Drucker boten einen kostengünstigen Aufbau sowie ein ausreichend großes Bauvolumen, sodass sie in der Lage waren durch Autoreplikation die Bauteile für weitere Drucker des gleichen Modells zu fertigen.⁹⁵ Dies führte letztendlich zur breiteren Verfügbarkeit derartiger Drucker. Statt mit dem von Stratasys geschützten Begriff FDM wird das Verfahren als *Fused Filament Fabrication* (FFF) bezeichnet.

Beim FFF wird die Eigenschaft thermoplastischer Polymere genutzt, bei Überschreiten der Glasübergangstemperatur einen Aggregatzustand zwischen fest und flüssig anzunehmen und damit modellierbar zu sein.⁹⁶ Ein Druckkopf erhitzt Kunststoffe auf die je nach Ausgangssubstanz spezifische zum Schmelzen benötigte Temperatur und presst diese dann durch eine feine Düse, wodurch die erste der Schichten (*Layer*) des späteren 3D-Modells entsteht. Während des Erhaltens verfestigt sich der Kunststoff wieder und die nächste Schicht wird aufgetragen. Hierdurch können komplexe Modelle und Geometrien in dem für dieses Verfahren typischen *Layer*-Aufbau gebildet werden. Als Ausgangsmaterialien dienen vor allem die Milchsäure Polylaktat (PLA), Acrylnitril-Butadien-Styrol (ABS), mit Glykol modifiziertes Polyethylenterephthalat (PETG) oder Polycaprolacton (PCL).

Eine Schemazeichnung eines Druckkopfes, Extruder genannt, ist in Abbildung 2 gezeigt. Das Filament wird zur Friktionsminimierung durch einen passgenauen Polytetrafluorethylen-Schlauch (PTFE) in den Extruder gezogen. Der hierfür verwendete Motor kann entweder direkt am *Extruder*-Schlitten hängen, was dann als *Direct-Drive-Extruder* bezeichnet wird. Alternativ ist auch eine Befestigung am Rahmen zur Gewichtsreduktion des *Extruder*-Schlittens möglich. Hier wird das Filament über einen Bowden-Schlauch vorgeschoben. Diese Form wird *Bowden-Extruder* genannt. Der PTFE-Schlauch leitet das Filament bis zum *Heatbreak*, in dem die thermische Trennung in eine kalte Zuführung und eine heiße Extrusionsseite erfolgt. Gekühlt wird die Zuführung passiv mittels Kühlrippen sowie aktiv durch einen aufsitzenden Lüfter. Das *Heatbreak* endet im Heizblock, der meist aus Aluminium besteht und die Wärme auf das Filament überträgt. Zum Aufheizen wird eine Heizpatrone genutzt, deren Temperaturwerte über einen danebenliegenden Thermistor kontrolliert und gesteuert werden. Das nun erhitzte und plastisch verformbare Filament wird dann durch eine Druckdüse, engl. *nozzle*, mit einem genau definierten Durchmesser gepresst. Dieser Durchmesser beeinflusst maßgeblich die späteren Basisparameter *Layer*-Breite (*line width*) und *Layer*-Höhe. Der erhitzte Kunststoff wird auf dem Druckbett abgelegt. Die Haftung wird je nach Schichthöhe vor allem durch den genau definierten Abstand zwischen Düsenspitze und Druckbett definiert. Die während des gesamten Druckprozesses erhaltene Druckbetthaftung des ersten *Layers* wird durch die

Beschaffenheit der Oberfläche und ein darunterliegendes Heizbett weiter verbessert.

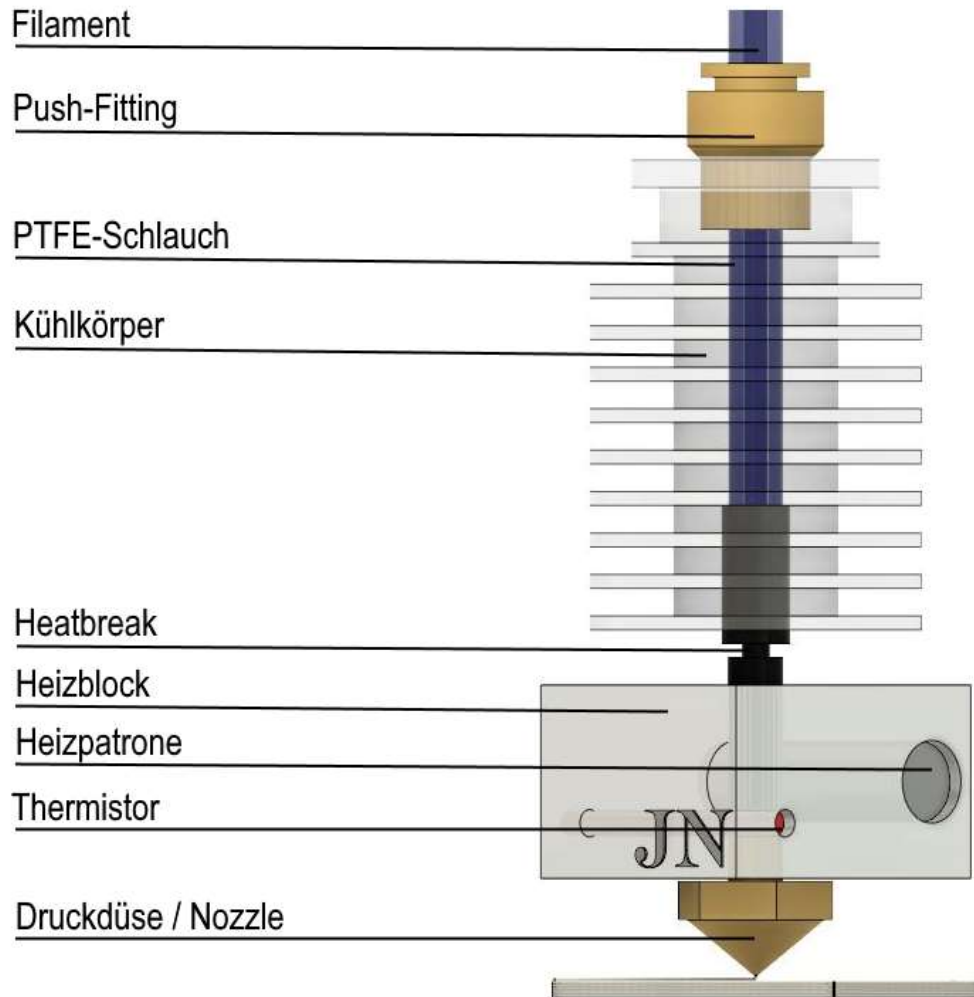


Abbildung 2: Aufbau eines *Extruders*

Durch Extrusion des Filaments an exakt definierten Punkten entsteht das Bauteil Schicht für Schicht. Die Ansteuerung dieser Koordinaten geschieht auf unterschiedliche mechanische Weisen. In dieser Arbeit wurde ein Portaldrucker (Abbildung 3) verwendet, weshalb auf die Erklärung des alternativen Delta-Aufbaus verzichtet wird. In einer der häufig verwendeten Bauweisen solcher Portaldrucker führt der Extruder-Schlitten die Achsenbewegungen in X-Richtung und das Heizbett jene in Y-Achsen-Richtung aus. Bewegungen in Z-Achsen-Richtung werden

im Falle des hier verwendeten ANET A6 durch Anheben der gesamten *Extruder-*Achse erreicht. Andere Systeme senken hierzu die Heizbettachse ab.

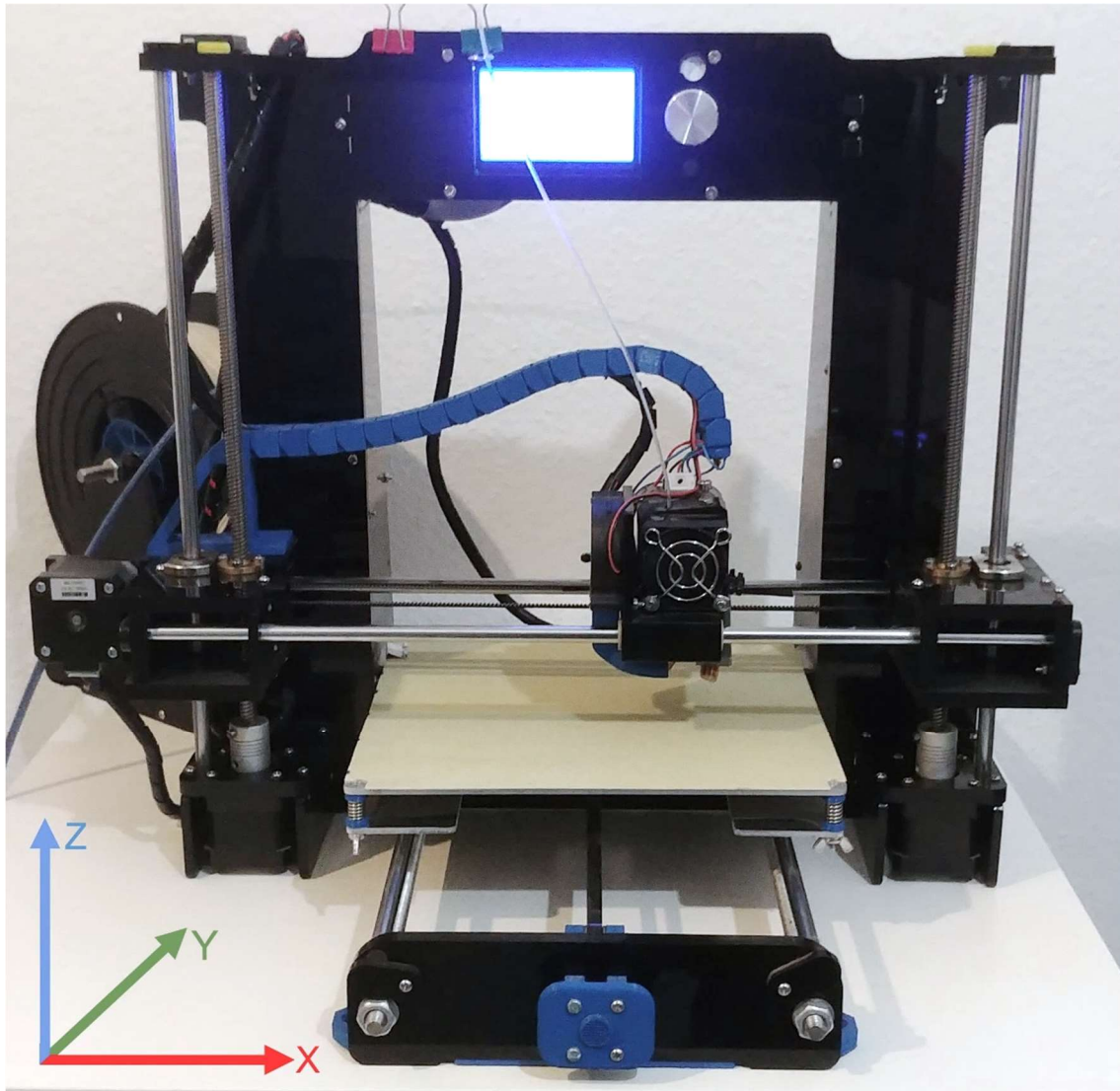


Abbildung 3: Portaldrucker mit Freiheitsgraden im Raum

Den Koordinaten, die die einzelnen Punkte des zu druckenden Modells definieren, wird ein fortlaufender Extrusionswert zugeordnet. Hierdurch wird eine genau definierte Menge Kunststoff während der Bewegung von Koordinate zu Koordinate extrudiert. Ein gängiges Format dieser Koordinatendarstellung ist der

sogenannte G-Code.⁹⁷ Ein kurzer Überblick über einige der Variablen des G-Codes zeigt Abbildung 4.

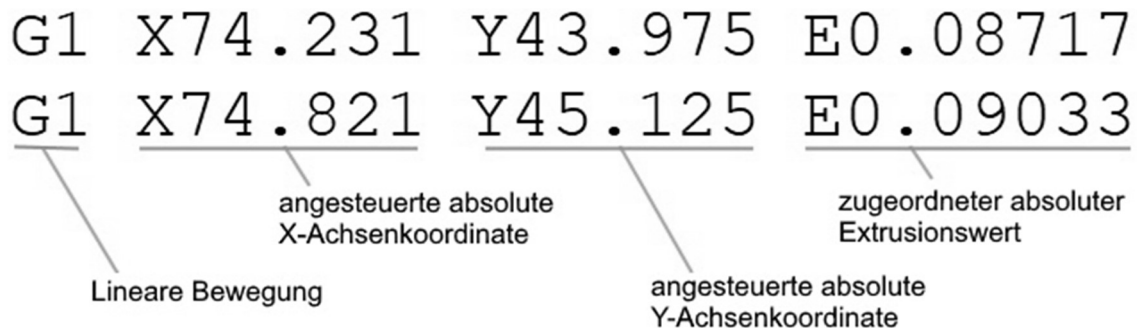


Abbildung 4: G-Code Erläuterung

Zunächst wird mittels G1-Befehles vorgegeben, dass es sich um eine lineare Bewegung handelt. Es folgen die anzusteuernenden X-, Y- und Z- Koordination. Der letzte Wert bewegt den Extruder-Motor und entspricht der Menge des extrudierten Kunststoffes.

Immer weitere Entwicklungen und Fortschritte halten Einzug in viele Forschungsgebiete, wie zum Beispiel der Weltraumforschung.⁹⁸ Doch auch im medizinischen Sektor findet der 3D-Druck ein wachsendes Anwendungsgebiet. Wurden im Jahr 2013 auf PubMed noch lediglich 100 Artikel mit dem Suchbegriff „3D print“ veröffentlicht, stieg diese Zahl fünf Jahre später schon auf 1815 Publikationen. Die klinische Anwendung erfolgt dabei bereits in vielen Bereichen wie der Zahnheilkunde⁹⁹, der Mund-Kiefer-Gesichts- bzw. Plastischen Chirurgie¹⁰⁰, aber auch der Unfallchirurgie.¹⁰¹

1.6 Ziele dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit stellte die Entwicklung eines mittels *Fused Filament Fabrication* (FFF) 3D-gedruckten Knochenersatzdesigns mit Integration kleiner funktionaler Einheiten in einer kompressionsfesten Makrostruktur dar, welche optimale Zellüberlebensbedingungen in allen Phasen der Knochenheilung bietet und zudem an die Größe des Knochendefekts anpassbar ist.

Hierzu wurde zunächst in Hinblick auf die geforderten idealen Scaffoldbedingungen und -parameter eine Designhierarchie entwickelt, aus der im Anschluss drei Designstudien ausgewählt wurden. Zudem wurde ein optionales Baukastensystem entworfen. Dieses soll das Hinzufügen weiterer Funktionen oder die Verwendung unterschiedlicher Designstudien in Kombination ermöglichen. Nach Erreichen einer optimalen Druckbarkeit erfolgte die Realisierung mittels des *FFF*-3D-Druck-Verfahrens. Dann wurden diese Scaffolds, bzw. deren funktionellen Untereinheiten, *in vitro* sowie mechanisch charakterisiert.

Die in dieser Arbeit entstandenen Designstudien sind als Konzeptvorstellung gedacht.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien: Entwicklung und 3D-Druck

2.1.1 Drucker

(modifizierter) ANET A6	Shenzhen Anet Technology Co., Shenzhen, China
-------------------------	--

2.1.2 Filamente

Polylaktat Filament 1,75mm "natur"	3dk.berlin, Berlin, Deutschland
Polylaktat Filament 1,75mm "verkehrsblau"	
Proto-Pasta Composite PLA Magnetic Iron	Proto Pasta, Vancouver, Kanada

2.1.3 Druckeraufrüstung

Raspberry Pi 3b+	Raspberry Pi Foundation, Cambridge, England
MKS GEN L V 1.0 Druckermainboard	Guangzhou Makerbase Industry Co. Ltd, Guangdong, China
DryLin® igus® Gleitlager	igus GmbH, Köln, Deutschland
Lüfter 5015 MF50151VX-A995015	Sunon, Kaohsiung, Taiwan
Lüfter 4010 HA40101V4-999	
Lüfter 8020 ME 80201V1-000U-A99	
Glasfaserverstärkter GT2-Riemen	Keine Herstellerangabe
Justierungsfedern	Keine Herstellerangabe
FR4 Platte	Keine Herstellerangabe

Messing-Düse 200µm	Keine Herstellerangabe
LED SMD 5050 Strip 30 LED/m IP67	Keine Herstellerangabe
Motortreiber TMC2208	TRINAMIC Motion Control GmbH & CO. KG, Hamburg, Deutschland
1,75 mm Teflonschlauch Heatpipe	Capricorn Premium Bowden Tubing, Indianapolis, USA

2.1.3.1 Gedruckte Aufrüstungen

X-Achsen Riemenspanner	Thingiverse-Thing #2761103
Filamentabroller	Thingiverse-Thing #3128594
LED-Leistenhalter	Thingiverse-Thing #2388311
Filament Führung	Thingiverse-Thing #1980281
Mainboardlüferrahmen	Thingiverse-Thing #1925353
Kabelkette	Thingiverse-Thing #2086896
Y-Rahmenverstärkung vorne	Thingiverse-Thing #1896013

2.1.4 Druckprozess - Software

CAD-Software: <i>Fusion 360</i> , Student Version	Autodesk, San Rafael, USA
<i>Octoprint</i> Version 1.3.6, AGPL-3.0	Entwicklerin: Gina Häußge
Slicer	Cura, Version 3.1.0 (Ultimaker, Geldermalsen, Niederlande)
<i>Arduino IDE</i>	GNU General Public License, Arduino Software

2.1.5 Mechanikversuche

Arduino Uno R3	Adafruit Industries, New York, USA
Gewindestangen und Eisenwaren	Keine Herstellerangabe
Siebdruckplatte	Keine Herstellerangabe
Plastikbox	Keine Herstellerangabe
a/d-Wandler und Messverstärker HX711	Keine Herstellerangabe
Wägezelle RBS10267	Robomall, n.n.b
Tire Tread Depth Gauge	IMEWE, China

2.2 Materialien: Laborversuche

2.2.1 Geräte

Sterilbank Steril-Antares	Antares, Köln, Deutschland
Wasserbad	Köttermann GmbH, Uetze, Deutschland
Schüttler Rotamax 120	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Biofuge fresco	
Kühlschrank Economic	Bosch AG, Stuttgart, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	Heraeus, Hanau, Deutschland
Brutschrank IG150 CO	Jouan GmbH, Unterhaching, Deutschland
Lichtmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop AxioObserver Z1	
NanoVue 4282 V2.0.4 Spectrophotometer	GE Healthcare, Chicago, USA

PCR Thermocycler Tpersonal	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipetus Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt Deutschland
Photometer	Ceres UV900c, Bio-Tek Instruments, Windoski, VT, USA
Working Rack	Stratagene, California, USA
Sputter Coater	Agar Scientific Ltd., Stansted, England
Elektronenmikroskop S-4500	Hitachi, Düsseldorf, Deutschland
Bechergläser	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Eppendorf-Reference Pipetten (10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.2.2 Verbrauchsmaterial

Untersuchungshandschuhe peha-soft nitrile	PAUL HARTMANN AG, Heidenheim, Deutschland
Riplate® square wells 24 Well	Ritter GmbH, Schwabmünchen, Deutschland
TC-Platte 6-Well Cell+	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
TC-Platte 24-Well Cell+	
TC-Platte 48-Well Cell+	
75 cm ² Kulturflasche	
175 cm ² Kulturflasche	
Transferpipetten 3,5 ml	
Eppendorf Mikroreaktionsgefäße	

Insulinspritzen	Becton Dickinson GmbH, Madrid, Spanien
Eppendorf-Pipettenspitzen (10-1000 µl)	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Serologische Pipetten (1-25 ml)	Corning, Inc, New York, USA
Falcon-Tube (15 ml, 50 ml)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, Deutschland
PCR 8-Cap und Tube Strips	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Neubauer Zählkammer DHC-N01	Thermo-Fisher, Schwerte, Deutschland
Sterilisierbare Pinzetten	Keine Herstellerangabe

2.2.3 Zellen

Saos-2-Zellen	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSZM, Braunschweig, Deutschland
---------------	---

2.2.4 Substanzen und Lösungen

2.2.4.1 Medien und Pufferlösungen

RPMI medium 1640, 21875-034	Thermo-Fisher, Schwerte, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline PBS ^{-/-} D8537	Invitrogen, Bleiswijk, Niederlande
Heat inactivated Fetal Bovine Serum, FBS, 16000044	Thermo-Fisher, Schwerte, Deutschland

Hepes, 1M ph 7.0-7.6, PHG0001	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Penicillin-Streptomycin P4333	
Accutase solution A6964	
DMSO Einfriermedium	
Diethyl-Pyrocbonat-Wasser, DEPC	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.2.4.2 Färbelösungen

CellTrace CFSE, C34554	Thermo-Fisher, Schwerte, Deutschland
DAPI, D9542	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen Deutschland
Alizarin-Rot S, TMS-008	

2.2.4.3 Fertigsysteme

Osteogenes Differenzierungs- kit, 05466 und 05467	STEMCELL Technologies, Köln, Deutschland
MTT Cell Proliferation Kit 1, 11465007001	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
RNeasy-Kit, Nr. 74106 - enthält Buffer RLT, RW1, RPE, RNase-Free Water	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase-Free DNase Kit 79254 - enthält DNase I, Buffer RDD,	
AffinityScript PCR cDNA Synthesis Kit, 600559 - Enthält cDNA Synthesis Master Mix, AffinityScript RT,	Stratagene, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland

Oligo(dT) Primer, RNase-Free Water	
RT ² qPCR SYBR Green/ROX Master Mix-24, Nr 330523	Qiagen, Hilden, Deutschland
RT ² qPCR Primer Assay, Nr 330001	

2.2.4.4 Primer

RT ² qPCR Primer Kollagen-1 alpha, PPH01299F	Qiagen, Hilden, Deutschland
RT ² qPCR Primer Alkalische Phospha- tase, PPH00643F	
RT ² qPCR Primer Osteocalcin, <i>bglap</i> , PPH01898A	
RT ² qPCR Primer <i>gapdh</i> , PPH00150E	

2.2.4.5 Sonstige Chemikalien und Reagenzien

CellTak, Cell and Tissue Adhesive, 354240	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazane	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Ethanol 100 % vol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisen- hofen Deutschland
Aqua dest.	
Formalin 36,5 % vol	

2.2.5 Software für Auswertungen und Zeichnungen

Zerene <i>Stacker Build T2018-07-19-1515</i>	Zerene, Richland, USA
Bildverarbeitungssystem <i>Digital Image Processing System (DIPS) 2.6</i>	Point Electronic, Halle, Deutschland
<i>Fritzing.org Build 0.9.3b (GNU GPLv3;</i>	Friends-of-Fritzing e.V., Potsdam, Deutschland
<i>Microsoft Office 365</i>	Microsoft Corp., Redmond, USA
<i>Draw.io</i>	JGraph Ltd., Northamptonshire, England

2.3 Methoden

2.3.1 Entwicklung der Knochenersatzdesigns

Die Designstudien wurden in Hinblick auf Integration und spätere Anpassbarkeit an den Knochendefekt als *Computer-Aided Design* in der Studentenversion von *Fusion 360* entworfen. Die Modellierung in *Fusion 360* geschah in einer Mischung aus *boundary representation* (BREP) und *constructive solid geometry* (CSG). BREP, also ein Begrenzungsflächenmodell, ermöglicht durch Definition der Begrenzungsflächen die daraus resultierenden Außenkanten und durch Zusammensetzen dieser Flächen einen Volumenkörper. In der CSG oder konstruktiven Festkörpergeometrie werden wiederum geometrische Grundkörper wie Zylinder oder Quader durch boolesche Operatoren miteinander verknüpft. Durch Addition und Subtraktion werden aus diesen Grundkörpern dann komplexe Strukturen erzeugt.

Im Anschluss wurden die 3D-Dateien als STL-Dateien (*Standard Triangulation Language*) exportiert.¹⁰²

2.3.2 Realisierung der Scaffolds

Die Designs wurden auf einem umfassend modifizierten FFF-3D-Drucker, dem ANET A6, gedruckt. Eine Liste der Modifikationen ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Überblick über die Modifikationen des 3D-Druckers

Y-Achse und Druckbett	
Modifikation	Wirkung
Riemen-Spanner	Bessere X-Achsen-Präzision
Umbau auf DryLin® igus® Gleitlager	Bessere Gleiteigenschaften, geringere Toleranzen, keine Schmierung notwendig
Polieren der Wellen	Bessere Gleiteigenschaften
Anpassen der Lagerböcke	Bessere Achsenlaufeigenschaften
Einbau eines glasfaserverstärkten GT2-Riemens	Keine Längenänderung beim Spannen
Stärkere Justierungsfedern mit flachen Enden und Federtellern	Kein Nachschwingen des Druckbetts, bessere Auflage
Angeraute FR4-Platte als Druckoberfläche	Bessere Druckbetthaftung, ebene Oberfläche

X-Achse	
Modifikation	Wirkung
DryLin® igus® Gleitlager	s.o.
Polieren der Wellen	s.o.
Einbau eines glasfaserverstärkten GT2-Riemens	s.o.

Z-Achse	
Modifikation	Wirkung
Z-Achsen-Gewindespindel-Befestigung oben	Verringern von Z-Achsen- <i>Wobble</i>

Extruder	
Modifikation	Wirkung
Messing-Düse mit 200 µm Durchmesser der Düsen Spitze	Verringerte <i>line width</i> , feinere Details
Radial-Bauteillüfter 5015	Verringern von Vibrationen, bessere Bauteilkühlung
Geänderter Lüfterkanal	
Vapo-Lager-Extruder-Lüfter 4010	Verringern von Vibrationen im Extruder-Schlitten
Lüfter-Unterlegblock	
Hochtemperatur-PTFE-Schlauch in <i>Heatpipe</i> und Zuführung	Bessere Toleranzen, keine Veränderung bei höherer Temperatur
Filamentabroller	Sanfteres Abrollen
LED-Leiste	Sichtbarkeit während des Drucks
Elektronik	
Modifikation	Wirkung
Einbau MKS Gen L 1.0 Board	Anpassbarkeit der Software und Treiber
Umbau auf TMC2208 Stepermotor-Treiber	Ruhigerer Motorlauf, weniger Vibrationen, genauere Ansteuerung
Mainboard-Lüfter 8020	Kühlung Mainboard und Stepper-Treiber
Kabelkette X-Achse	Kabelführung
Rahmen	
Modifikation	Wirkung
Y-Rahmenverstärkung	Verwindungsstabilität, Befestigung auf Untergrund
Gummiauflage	Verringern von Vibrationen

Die Steuerungs-Software des 3D-Druckers, *Marlin* (Version 1.1.4), kann STL-Dateien nicht direkt verarbeiten. Aus diesem Grund werden die exportierten STL-Dateien in das koordinatenbasierte Dateiformat G-Code (siehe Abschnitt 1.5) konvertiert. Dies geschah mit der Software *Cura* in der Version 3.1.0. Zunächst wurde mittels Druckbarkeitsstudien die optimalen Druckeinstellungen ermittelt. Im Anschluss wurden die nun optimierten G-Codes durch direkte Integration in *Cura* kabellos auf den Einplatinencomputer Raspberry Pi 3b+ mit dem *open-source* Druckserver *Octoprint* (Version 1.3.6, AGPL-3.0) übertragen. Dieser dient gleichzeitig zur Steuerung des 3D-Druckers und der Verarbeitung des G-Codes. Die Befehle werden vom Raspberry Pi über ein USB-Kabel an den Drucker gesendet. Es wurde ein absolutes Positionierungsverfahren des Druckkopfs (G-Code Befehl: G90) verwendet. Dies bedeutet, dass die Koordinaten im G-Code absolute Positionen innerhalb des Bauraums bezeichnen.

Der Aufbau eines *Extruders* wurde bereits in Abschnitt 1.5 erläutert. Im Falle des ANET A6 handelt es sich um einen *Direct-Drive-Extruder*: Der *Feed-Motor* sitzt direkt auf dem *Extruder*-Schlitten. Wie beschrieben erreicht der Druckkopf im Druckbereich sämtliche Positionen in X- und Z-Achsen-Richtung, während Bewegungen in Y-Achsen-Richtung vom Druckbett ausgeführt werden (siehe Abbildung 3). Das Druckbett wurde mit einer angerauten FR4-Glasfaser-Platte (*Flame Retardant Klasse 4*) ausgestattet, die während des Druckprozesses konstant auf 50 °C erhitzt wird. Als Grundsubstanz wurde ein Filament aus Polylaktat (PLA) verarbeitet. Zur Vermeidung unbekannter chemischer Zusätze, wie ggf. toxischer Farbstoffe, wurde für die Zellversuche das PLA-Filament in der Farbe „natur“ verwendet. Im Anhang befinden sich die Konformitätserklärung (Anhang 1) und das technische Datenblatt (Anhang 2). Das Filament wurde im Druckkopf auf 200 °C erhitzt und durch eine 200 µm durchmessende Druckdüse schichtweise prozessiert. Es wurde eine Schichtbreite von 200 µm, eine Schichthöhe von 100 µm und eine Basisdruckgeschwindigkeit von 40 mm/s gewählt. Eine bessere Druckbettadhäsion wurde, im Falle der Untereinheiten der Scaffolds, durch ein sogenanntes *Raft* erreicht. Ein *Raft* ist eine mehrlagige Basisschicht aus dem gleichen Druckfilament zu Beginn des Druckes. Das Scaffold wird anschließend mit geringem Abstand auf das *Raft* gedruckt. Bei großen Scaffolds wurde ein *Skirt* genutzt. Ein *Skirt* dient vor allem dazu den Extruder vorzubereiten und ausreichend

Material in die Spitze der Druckdüse zu fördern. Ähnlich einem *Raft* gibt es noch das sogenannte *Brim*, welches durch eine einlagige Schicht um das Bauteil die Kontaktfläche zum Druckbett erhöht. Beispiele der unterschiedlichen Bettadhäsionstypen sind in Abbildung 5 zu sehen.

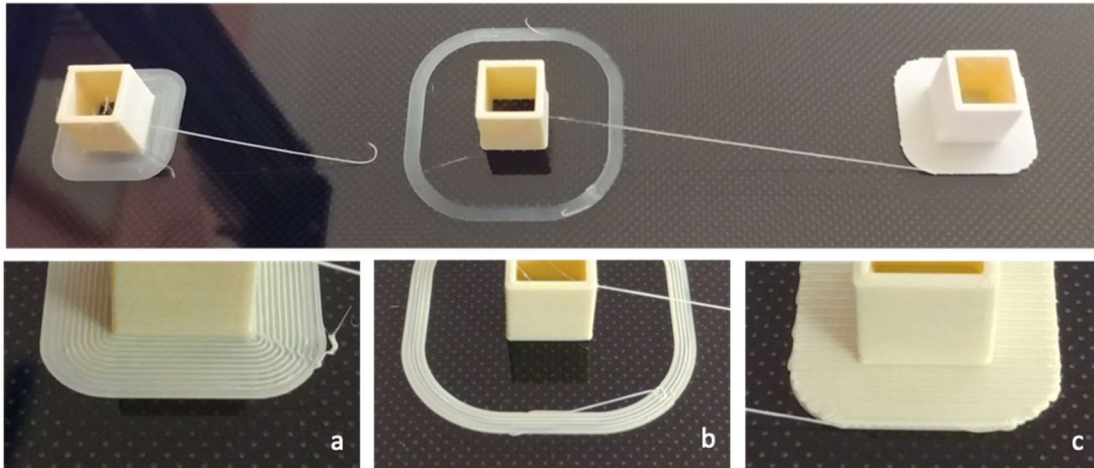


Abbildung 5: Bettadhäsionstypen

Zu sehen sind eine Übersichtsaufnahme oben und Detailaufnahmen von *Brim* (a), *Skirt* (b) und *Raft* (c) unten.

Nach der Extrusion des Materials erfolgte das zügige Herabkühlen mithilfe eines Bauteillüfters zur Vermeidung von Verzug.

Für die näherungsweise Ermittlung der Basisparameter Oberfläche und Volumen wurden Berechnungen in *Fusion 360* durchgeführt. Anschließend wurden die Bauteile gewogen.

2.3.3 Mediumherstellung

Zur Zellkultivierung wurden zwei Arten von Nährmedien verwendet. Zum einen, im Folgenden als Standard-Medium bezeichnet, wurde RPMI 1640 Medium 10 % Fetal Bovines Serum (FBS), 2 % HEPES, 100 IU/ml Penicillin und 0.17 mM Streptomycin zugesetzt. Das in den Versuchen zur osteogenen Differenzierung (Abschnitt 3.5) verwendete Medium wird im Weiteren als Osteogenes Medium bezeichnet. Zur Herstellung dessen wurden dem RPMI 1640 Medium 2.5 % FBS, 2 % HEPES, 100 IU/ml Penicillin, 0,17 mM Streptomycin, 1.14 mM Ascorbinsäure, 0.1 M β -Glycerophosphat und 0.1 μ M Dexamethason zugefügt.

2.3.4 Kultivierung der Saos-2-Zellen

Es erfolgte eine *in vitro* Evaluation von auf den Designstudien ausgesäten Zellen in den folgenden Kernaspekten: Zelladhäsion, metabolische Aktivität und osteogene Differenzierung. Hierfür kamen Saos-2-Zellen (Ansatz vom 21.03.2011) der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen zum Einsatz.

Die in Cryotubes bei -195 °C in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden bei 37 °C unter leichtem Schwenken im Wasserbad aufgetaut. Nach sofortigem Verdünnen des Einfriermediums (30 % DMSO, 70 % FBS) mit 10 ml Standard-Medium und Zentrifugation bei 400 G für 7 min, erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 1 ml PBS^{-/-} bei identischen Zentrifugationsbedingungen. Das Zell-Pellet wurde nach Verwerfen des Eluats mithilfe einer Transferpipette in 12 ml Standard-Nährmedium resuspendiert. Anschließend wurden je 3 ml zusammen mit weiteren 9 ml frischem Standard-Nährmedium in eine 75 cm² Kulturflasche übertragen. Inkubiert wurden die Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator.

Der erste Mediumwechsel erfolgte am Tag darauf. Die weiteren Mediumwechsel wurden zweimal pro Woche durchgeführt. Hierzu wurde die Flasche für kurze Zeit aufrecht gestellt und anschließend das alte Medium entfernt. Dann wurde 12 ml frisches, auf 37 °C vorgewärmtes Standard-Medium zugegeben.

Nach Erreichen einer mikroskopisch kontrollierten Ausbreitung des Zellrasens über 75 % des Kulturflaschenbodens konnten die Zellen nach folgendem Schema entnommen und für die Versuche verwendet werden: Nach Equilibrieren der Temperatur von Nährmedien und Chemikalien auf 37 °C wurde das alte Medium der Zellkulturflasche entnommen und nicht-adhärenente Zellen sowie Zelldetritus durch einen Waschschrift mit 3 ml PBS^{-/-} entfernt. Dann wurden 3 ml Accutase hinzugegeben und 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnten die Zellen unter leichtem Spülen mit weiteren 3 ml Standard-Nährmedium gelöst werden. Nach Zentrifugation (7 min bei 400 G) und Entfernen des Mediums wurde die Zelldichte mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die restlichen Zellen wurden zusammen mit 12 ml frischem Nährmedium erneut auf die Zellkulturflaschen aufgeteilt und dienten als Vorrat für weitere Versuche.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde das Zellpellet in 1 ml frischem Nährmedium gelöst. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 90 µl PBS^{-/-} in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Hiervon wurden weitere 10 µl auf die beiden Seiten der Zählkammer gegeben. Quadrantenweises Auszählen unter dem Mikroskop erbrachte unter Zuhilfenahme der Formel

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \text{Zellzahl}_{\text{Array}} * 10 (\text{Verduennungsfaktor}) * 10000$$

die Zellzahl in 1 ml Suspension. Mittels eines Dreisatzes wurde durch Zugabe von Standard-Medium zur Ausgangssuspension die Zelldichte eingestellt.

2.3.5 Desinfektionstest

Bevor die Scaffolds besiedelt werden konnten, wurde die optimale Desinfektionsdauer ermittelt. Dazu wurde 100 % vol Ethanol im Verhältnis 7:3 mit vollentsalztem Wasser gemischt. Jeweils eine kurze und eine lange Einzelsäule wurden in einem Well einer 6-Well Platte für je 5 min, 10 min und 20 min vollständig mit dem hergestellten 70 % vol Ethanol bedeckt. Nach der jeweiligen Zeitspanne wurden die Einzelsäulen für 10 min in einem neuen sterilen Well getrocknet. Anschließend wurden sie in eine weitere Well-Platte überführt und RPMI-Medium ohne weitere Zusätze zugegeben. Zwei Testsäulen in RPMI-Medium ohne vorherige Ethanol-Desinfektion dienten als Positivkontrolle. Die mikroskopisch kontrollierten Auswertungen auf bakterielle bzw. pilzliche Kontamination erfolgten an Tag 1-7.

2.3.6 Erstellen eines Beschichtungsprotokolls

2.3.6.1 Desinfektion

Die Scaffolds wurden 10 min in 70 % vol Ethanol in einer 12-Well Platte desinfiziert. Anschließend wurden die Scaffolds für 12 Stunden im Well einer weiteren 12-Well Platte getrocknet.

2.3.6.2 Beschichtung der Scaffolds mit CellTak

Die PLA-Oberfläche wurde jeweils vor den Versuchen mit CellTak beschichtet. Diese Beschichtungssubstanz und deren Herkunft ist unter 4.3 genauer beschrieben. CellTak wurde mit PBS^{-/-} 1:100 auf eine Konzentration von 15.9 µg/ml verdünnt und die Scaffolds mit dieser Lösung in einer 24-Well Platte vollständig bedeckt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur und Überführen in ein neues Well trockneten die Scaffolds für eine Stunde.

2.3.7 Aussaat und Zelladhäsion von Saos-2-Zellen auf Scaffolds

Die Scaffolds wurden nach zuvor beschriebenem Vorgehen desinfiziert und mit CellTak beschichtet (Abschnitt 2.3.6.1-2.3.6.2).

2.3.7.1 Zellaussaat und CFSE-DAPI-Färbung

Der Fluoreszenzfarbstoff CFSE (Carboxyfluoresceinsuccinimidylester) bindet nach Penetration der Zellmembran an intrazelluläre Moleküle. Zunächst erfolgte die Herstellung einer 5 mM CFSE-Arbeitslösung. Hierzu wurde 1 *Vial* CFSE Component A in 18 µl DSMO (Component B) gelöst. Dann wurden 5 µl dieser Lösung zu 2500 µl PBS^{-/-} zugegeben und im Anschluss auf 37 °C vorgewärmt. Die Saos-2-Zellen wurden wie zuvor beschrieben geerntet und das nach Zentrifugation entstandene Zellpellet nach Entfernen des Überstandes in der CFSE-Arbeitslösung resuspendiert. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei 37 °C im Wasserbad. Nach erneuter Zentrifugation (7 min bei 400 G) und Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in 4 ml vorgewärmtem Standard-Medium resuspendiert und erneut für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt und Mediumwechsel.

Nun wurde die Zelldichte nach der zuvor beschriebenen Methode mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die für die Aussaat verwendeten Zellzahlen sind in Tabelle 2 dargestellt. Anschließend wurde die Zelllösung tropfenweise auf die Scaffolds aufgebracht. Nicht adhärente, sondern weiterhin im Medium befindliche Zellen wurden mit einer Pipette drei weitere Male aufgenommen und erneut tropfenweise über die Scaffolds gegeben. Es folgte die Inkubation für 10 min bei 37

°C im Inkubator. Anschließend wurde die Zellsuspension erneut aufgeträufelt. Dieser Schritt wurde insgesamt dreimal wiederholt, bevor die Scaffolds für 24 h bei 37 °C inkubiert wurden.

Tabelle 2: Bauteilhöhe und Zellzahlen auf unterschiedlichen Scaffoldtypen

Bauteil	Versuch	Zellzahl
Alle Modelle 20 mm Höhe	MTT, Mechanische Tests	10^6
Raster + Zwiebel Scheibe 5 mm Höhe, Tempel Einzelsäule	Desinfektionstests, CFSE-DAPI-Färbung, Rasterelektronenmikroskopie, Alizarin-Färbung, Genexpressionanalyse	5×10^6

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ist ein weiterer Fluoreszenzfarbstoff, der sich im Nukleus in AT-reichen Regionen anreichert. Er diente als Gegenfärbung zum CFSE. Nach der 24-stündigen Inkubation wurden die Scaffolds zweimal mit PBS^{-/-} gewaschen und anschließend in 1 % vol Formalin in PBS^{-/-} für 10 min fixiert. Einer 5-minütigen Inkubation in 1 % DAPI in PBS^{-/-} folgten drei weitere Waschschriffe mit PBS^{-/-}.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden die adhärenfen Zellen in zufällig gewählten Hauptgesichtsfeldern bei 488 nm und Emissionsfilter für Fluoreszin bei 100-facher Vergrößerung evaluiert.

2.3.7.2 Rasterelektronenmikroskopie

Zur Evaluation der unbesiedelten sowie besiedelten Oberfläche wurden Bilder mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) angefertigt. Hierzu wurden die für 21 Tage besiedelten Scaffolds zunächst in 2 % Glutardialdehyd in PBS^{-/-} für 10 min fixiert. Dann durchliefen die Scaffolds eine aufsteigende Ethanolreihe (50 % vol, 75 % vol, 96 % vol, 100 % vol) für je 5 min. Es folgte eine kurze Passage in 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan und Trocknung für 24 h.

Nun wurden sowohl die besiedelten als auch die unbesiedelten Scaffolds mittels Kathodenzerstäubung für 5 x 60 s mit einer feinen Goldschicht beschichtet. Die Visualisierung und Auswertung erfolgte dann mit dem

Rasterelektronenmikroskop und digitaler Bildverarbeitungssoftware DIPS 2.6 (Digital Image Processing System).

2.3.8 Zellaktivität

Um die Zellaktivität der Saos-2-Zellen auf den Scaffolds zu evaluieren, wurde eine MTT-Zell-Proliferationstestreihe durchgeführt. In dieser wird das gelbe Tetrazolium-Salz Methylthiazolyltetrazolium (MTT) zu violetter Formazan reduziert.

Zunächst wurden die Scaffolds nach dem bereits beschriebenen Desinfektions-, Beschichtungs- und Aussaatprotokoll mit Saos-2-Zellen besiedelt und bei 37 °C inkubiert. Alle 24 h erfolgte ein Mediumwechsel. Nach 1, 7, 14 und 21 Tagen wurden dann je Designstudie 3 MTT-Tests durchgeführt. Um die nicht dem Scaffold, sondern dem Well adhärenen Zellen auszuschließen, wurden die Scaffolds zunächst vorsichtig in ein neues Well umgesetzt. Anschließend wurde das MTT-*Labelling* Reagenz 1:10 mit PBS^{-/-} verdünnt. Diese Arbeitslösung wurde dann erneut mit Standard-Medium auf 1:10 verdünnt und zu den Scaffolds gegeben. Ein Well ohne Zellen diente als Nullreferenz. Nach 4-stündiger Inkubationszeit im Inkubator wurde ein gleicher Volumenanteil der Solubilisierungs-Lösung zugegeben und die Scaffolds für 12 h inkubiert. Der Überstand wurde nun dreimal durch die Scaffolds gespült, um einen großen Anteil des umgesetzten Formazans aus den Scaffolds zu lösen. Mit einem Photometer wurde im Anschluss die Absorption bei 570 nm bestimmt und anhand der zuvor erstellten Kalibrierungskurve (mit 5×10^6 , 10×10^6 und 15×10^6 Zellen in Medium auf leeren Wells) normalisiert.¹⁰³

2.3.9 Osteogene Differenzierung

2.3.9.1 Kultivierung

Die Desinfektion und Aussaat der Saos-2-Zellen, welche eine osteogene Differenzierung durchlaufen sollen, erfolgte analog zu den vorherigen Versuchen. Für 7 Tage wurden die Zellen auf den Scaffolds in Standard-Medium kultiviert. Nach Tag 7 erfolgte dann der Wechsel auf das Osteogene Medium, wie unter Abschnitt 2.3.3 beschrieben. Die Kultivierungsdauer der einzelnen Versuche ist in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3: Kultivierungsdauer der Versuche

Versuch	Kultivierungsdauer (d)
Desinfektionstests	7
CFSE-DAPI-Färbung	1
Rasterelektronenmikroskopie	21
Zellaktivität (MTT)	1, 7, 14, 21
Alizarin-Färbung	21
Genexpressionsanalyse	21

2.3.9.2 Alizarin-Rot-Färbung

Die Alizarin-Rot-Färbung weist Calcium-Ionen nach. Diese werden, an Phosphat gebunden, in die von osteogen differenzierten Zellen produzierte extrazelluläre Matrix aus Proteinen wie Kollagen oder Osteocalcin eingelagert.

Zunächst wurde die Alizarin-Grundlösung hergestellt. Hierfür wurden 0.5 g Alizarin-Rot mit 45 ml Aqua dest. vermischt. Durch Zugabe einer 0,28 % vol Ammoniak-Lösung wurde der pH-Wert auf 6,36-6,4 eingestellt.

Nach 21 Tagen Besiedelung der Scaffolds wurden diese zu Beginn 10 min in 1 % vol Formalin fixiert. Nach Absaugen der Fixierlösung und dreimaligem vorsichtigem Spülen mit Aqua dest. wurde die Alizarin-Grundlösung zugegeben. Es folgte die Inkubation der lichtundurchlässig abgedeckten Scaffolds für 10 min bei Raumtemperatur, bevor die Färbelösung abgesaugt wurde und die Scaffolds erneut in drei Durchgängen mit Aqua dest. gewaschen wurden. Die Auswertung erfolgte mittels Hellfeldmikroskopie in zufällig gewählten Hauptgesichtsfeldern.

2.3.9.3 Genexpressionsanalyse

Es wurden die Gene für *collagen-1* alpha (*col1*), Alkalische Phosphatase (*alp*) und Osteocalcin (engl. *bone γ -carboxylglutamic acid-containing protein*, kurz *bglap*) sowie das sogenannte *Housekeeping*-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*gapdh*) untersucht. Zunächst wurden sämtliche Scaffolds (n=2) nach oben beschriebenen Methoden für 7 Tage unter Standard-Medium besiedelt. Es folgten für die Vergleichsgruppe weitere 14 Tage in Standard-Medium und für die Versuchsgruppe 14 Tage in Osteogenem Medium, bevor an Tag 21

die Auswertung stattfand. Für jedes Scaffold und Gen wurden zwei Wiederholungen durchgeführt.

2.3.9.4 RNA-Isolierung und DNA-Verdau

Zunächst fand die RNA-Lysierung der auf den Scaffolds wachsenden Zellen statt. Hierzu wurde ein RLT-Lysis-Puffer aus RLT-Puffer und β -Mercaptoethanol mit einem Mischungsverhältnis von 1:100 hergestellt. Es folgte die Zugabe zu den Scaffolds und 5-minütiges Rütteln. Anschließend wurde der Überstand in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und fünfmalig mit einer Insulinspritze geschert. Um sämtliche PCR-Messungen zur gleichen Zeit durchzuführen, wurden die RNA-Lysate bis zum Zeitpunkt der kompletten Probengewinnung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und gelagert.

Zur RNA-Isolierung wurde das *RNeasy*-Kit der Firma Qiagen verwendet. Nach Auftauen aller Proben wurden jeweils $350\text{ }\mu\text{l}$ des Lysats mit $350\text{ }\mu\text{l}$ 70% vol Ethanol gemischt und anschließend auf die *RNeasy*-Säule gegeben. Es folgte eine Zentrifugation für 15 s bei 10.000 U/min . Das entstandene Eluat wurde verworfen und $350\text{ }\mu\text{l}$ Puffer *RW1* zugegeben. Nach Zentrifugation bei gleichen Zentrifugationsbedingungen wurde das Eluat erneut verworfen. Mithilfe des *RNeasy mini spin* konnten etwaige Rest-DNA-Bestandteile entfernt werden. Hierzu wurde die DNase-Verdau-Stock-Lösung (bestehend aus DNA-Lysophilisat und RNase-freiem Wasser) aufgetaut und je Probe $10\text{ }\mu\text{l}$ mit $70\text{ }\mu\text{l}$ RDD-Puffer versetzt sowie auf die *RNeasy* Silica-Gel Membran gegeben. Nach einer Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur fand ein erneutes Waschen durch Zugabe von $350\text{ }\mu\text{l}$ Puffer *RW1* sowie Zentrifugation für 15 s bei 10.000 U/min statt. Das *RNeasy mini spin* Gefäß wurde in ein neues Sammelgefäß gestellt, $500\text{ }\mu\text{l}$ *RPE* Puffer zugegeben und erneut für 15 s bei 10.000 U/min zentrifugiert. Es folgte das erneute Verwerfen des Eluats, die Zugabe von $500\text{ }\mu\text{l}$ Puffer *RPE* und ein weiterer Zentrifugationsschritt für 2 min bei 13.000 U/min . Die Säule wurde in ein neues Sammelgefäß gesetzt und $50\text{ }\mu\text{l}$ Diethyl-Pyrocyanat-Wasser (DEPC-Wasser) als RNase-Inhibitor zugegeben. Nach 2-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde abermals für eine Minute bei 10.000 U/min zentrifugiert und die Proben in ein Eppendorf-Gefäß überführt.

Die RNA-Konzentration konnte anhand der optischen Dichte im Spektralphotometer *NanoVue* 4282 V2.0.4 abgeschätzt werden. Durch Absorption bei unterschiedlichen Wellenlängen können Rückschlüsse auf die Quantität bestimmter Inhalte gezogen werden: Die Absorptionsmaximum von Phenol liegt bei 230 nm, von Nukleinsäuren bei 260 nm, von Proteinbestandteilen bei 280 nm. Zur Hintergrundkorrektur wird eine Wellenlänge von 320 nm genutzt. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm ermöglichte Rückschlüsse auf Proteinfreiheit der Präparation.

2.3.9.5 cDNA-Synthese

Verwendet wurde das *AffinityScript PCR cDNA Synthesis Kit* (Stratagene) zur reversen Transkription der RNA in cDNA. Je Probe wurden zunächst 10 µl Mastermix, 3 µl Oligo DT Primer und 1 µl *Affinity Script RT* (Reverse Transkriptase) zusammengegeben. Die im vorherigen Abschnitt (2.3.9.4) isolierte RNA wurde mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 6 µl eingestellt und anschließend zu dem zuvor hergestellten Mix zugegeben. Hierdurch wurde die RNA mittels der Reverse Transkriptase-Aktivität und der Oligo DT Primer in einen cDNA-Strang umgeschrieben. Dies geschah über folgendes Thermocycler-Protokoll: 5 min bei 25 °C, 15 min bei 42 °C und 5 min bei 95 °C, dann sofortiges Herunterkühlen der Proben auf Eis. Nun wurden die Proben bis zum nächsten Tag bei -80 °C gelagert.

2.3.9.6 RT qPCR

Unter Einsatz des *RT² qPCR SYBR Green/ROX Master Mix-24* und des *RT² qPCR Primer Assay* wurde die RT-qPCR durchgeführt. Es wurden je 2 µl des cDNA Ansatzes mit 3 µl Aqua dest. versetzt und diese 5 µl in 8-strip Cups in vorgekühlte Metall-Well-Platten pipettiert. Zusätzlich wurden 20 µl Primer Mix hinzugegeben. Dieser beinhaltete je Probe 12,5 µl SYBR Green, 6,5 µl Aqua dest. und je 1 µl des jeweiligen Primerpaars (*col1*, *alp*, *bglap*, *gapdh*). Das Thermoprofil für die nun mit 25 µl befüllten Cups beinhaltete folgende Schritte: Zunächst 10 min bei 95 °C, 40 Wiederholungen einer 15 s andauernden Phase mit 95 °C im Wechsel mit einer Minute bei 60 °C.¹⁰³

So wurden Schwellenwertzyklen oder engl. *Cycle Thresholds* bis zum Erreichen des eingestellten Detektionsschwellenwerts der Fluoreszenzintensität für jedes Gen ausgegeben.

2.3.9.7 Auswertung der RT qPCR-CT Werte

Die Auswertung der CT-Werte erfolgte mittels Livak-Methode als Verhältnis zum *Housekeeping*-Gen *gapdh*.¹⁰⁴

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{[(C_{T\ GOI\ SampleA} - C_{T\ HkG\ SampleA}) - (C_{T\ GOI\ SampleB} - C_{T\ Hk\ SampleB})]}$$

Als *Sample A* wurden die CT-Werte der Scaffolds unter osteogener Differenzierung, als *Sample B* diejenigen in Standard-Medium benannt.

2.3.10 Mechanische Evaluation

Für die mechanische Evaluation der Designstudien wurde ein Versuchsstand gebaut, welcher die Kraftwirkung in axialer Richtung auf das Design misst und der Kompressionsstrecke des Scaffolds gegenüberstellt.

Der Teststand besteht aus einem Rahmen aus M10 Gewindestangen, einer Grundplatte aus 20 mm Siebdruckplatten und 3D-gedruckten Verbindungsteilen (Abbildung 6). Der zunächst aus einem umgebauten Mutternsprenger bestehende Druckstempel wurde wieder verworfen und stattdessen eine eigens entworfene Linearführung mittels Gewindemuffen verwendet. Als Stempel wurde eine M12 Schraube verwendet. Diese drehte sich durch den Aufbau nicht mit, sondern führte nur eine lineare Bewegung aus. Gleichzeitig wurde über die Schraube der Bereich eingestellt, in dem sich der Stempel bewegt. Nach oben wurde die Linearführung über ein gekapseltes Rillenkugellager (6003RS) verankert. Zwei halbe Unterlegplatten mit gefastem innerem Radius schützten zusätzlich gegen eine Rotation der Linearverankerung.

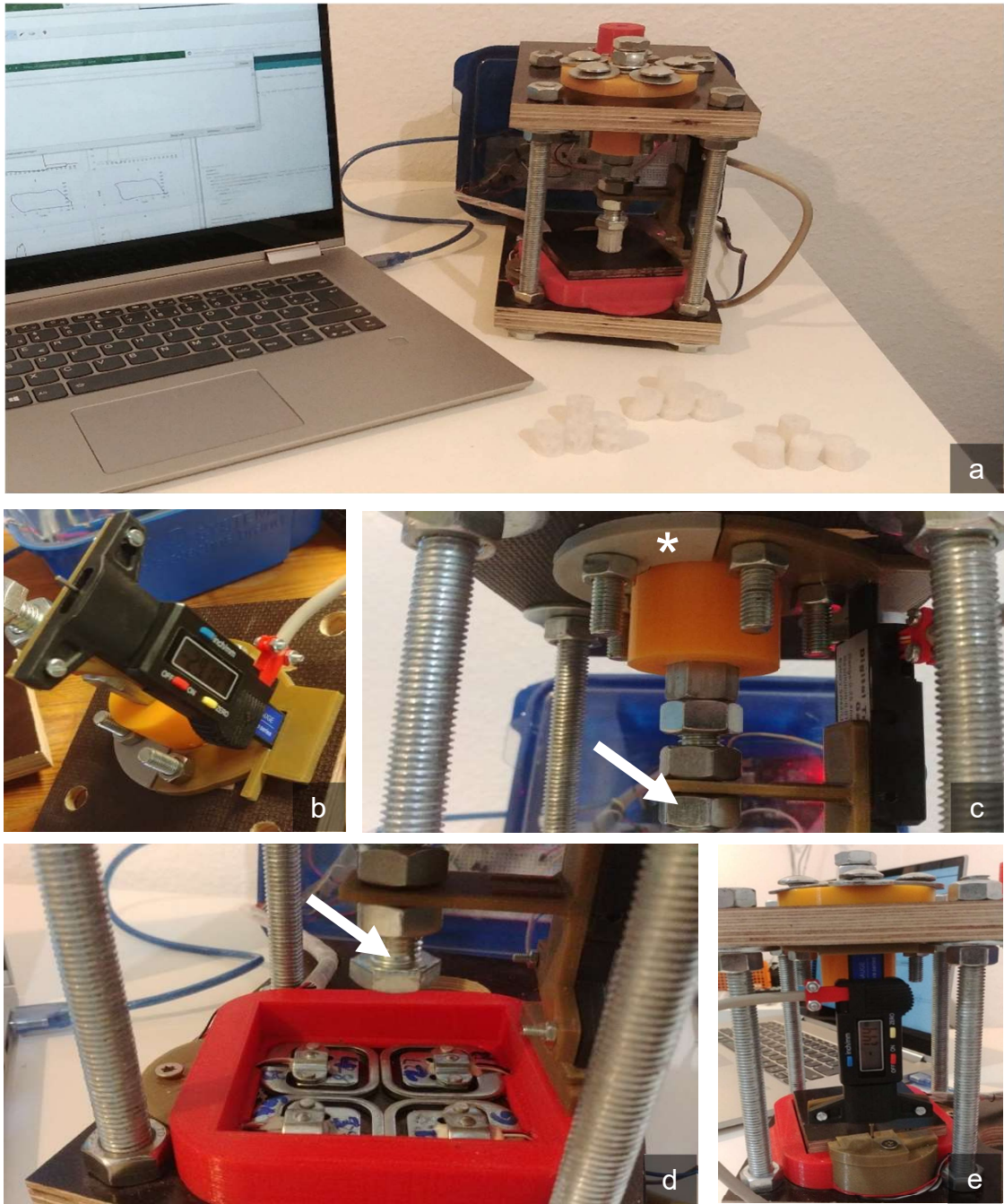


Abbildung 6: Mechanischer Teststand

Übersichtsaufnahme des Teststands mit Verbindung zum seriellen Monitor am Laptop (a). Aufnahme des Profiltiefenmessers und dessen Verankerung mit linearer Führung im Teststand (b, e). Druckstempel mit linearer Führung (Pfeil), im oberen Bereich des Bildes sind die gefasten Verankerungsplatten (*) gegen Rotation zu sehen (c, e). Blick auf die Wägezellen in deren lockerer Verankerung unterhalb der Druckplatte (d).

Ein umgebauter Reifentiefenprofilmesser (Auflösung 10 μm) maß die Auslenkung des Druckstempels in Z-Richtung. Die Achse, auf der sich die elektronische Messeinheit des Messgeräts bewegt, wurde am Rahmen verankert. Im oberen Bereich wurde hierzu eine Klemmverbindung mit Keil, im unteren Bereich eine Nut entworfen. Die Messeinheit wurde durch Schraubverbindung am Druckstempel bewegt und führt die Bewegungen dessen mit aus. Hierdurch konnte die aktuelle absolute Position des Druckstempels überwacht werden. Da der Profiltiefenmesser zunächst nur ein Display besaß, die Daten jedoch auch digital aufgenommen wurden, wurde ein Adapter entworfen, der mit Drahtenden versehen in die Schnittstelle des Profiltiefenmessers eingesteckt werden konnte. Über eine elektronische Schaltung (Abbildung 7) wurden die Informationen an einen Arduino Uno gesendet, der die Daten im seriellen Monitor der *Arduino IDE* am PC in Echtzeit ausgab.

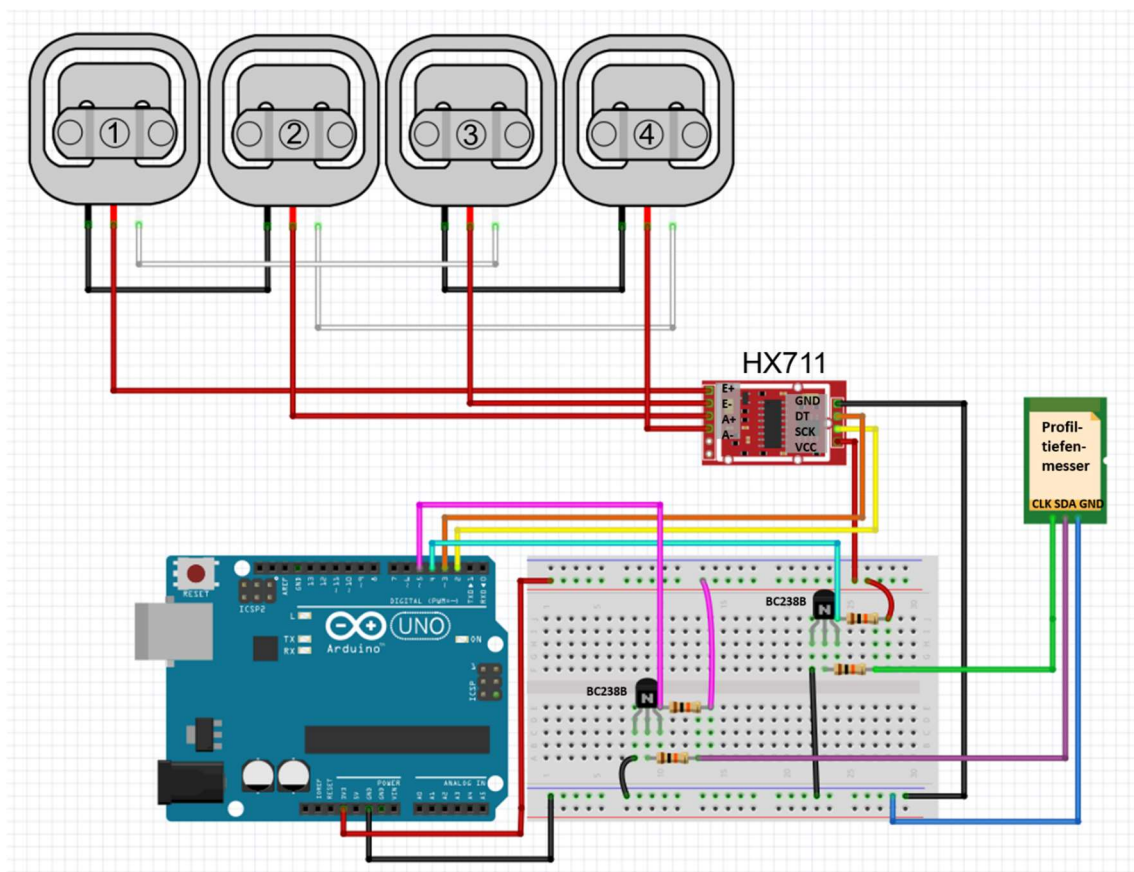


Abbildung 7: Schaltplan / *Fritzing*-Darstellung des Messstandes

Der Druckstempel übertrug die ausgeübte Kraft in axialer Richtung über die Designstudie in eine aus einer Siebdruckplatte bestehende Bodenplatte. Diese wurde gegen Verrutschen durch eine lockere Verankerung in einem Rahmen geschützt. Unter der Bodenplatte lagen vier 500 N Halbbrücken-Wägezellen (RBS10267). Die Gewichtskraft der Bodenplatte und des Scaffolds wurde vor dem Messvorgang durch automatisches Trieren herausgerechnet. Die vier Wägezellen waren als *Wheatstone*-Brücke verschaltet. Nach Herausführen der Kabel über Kabelführungen im Verankerungsrahmen wurden diese auf einen 24-bit analog-digital Wandler und Verstärker (HX711) geschaltet. Das über die *Arduino IDE* geschriebene Programm verarbeitete sowohl die Ausgabe des Profiltiefenmessers als auch der Wägezellen und gab diese im seriellen Monitor aus. Die graphische Wiedergabe der Daten erfolgte in *Microsoft Excel* für jeweils drei Modelle jeder Designstudie.

Die Auswertung erfolgte in einem zweistufigen Verfahren. Im ersten Schritt wurde der Bereich des Versagens eingegrenzt und die hierfür notwendige Stauchungstrecke abgeschätzt. Jedes einzelne Scaffold wurde dreimal hintereinander auf 1,5 mm Tiefe zusammengepresst und dabei die auf die Scaffolds wirkende Kraft verglichen. Dieser Vorgang wurde anschließend diskret mit 2 mm und 2,5 mm wiederholt.

Im nächsten Schritt wurden je drei Scaffolds dann stetig zusammengepresst und die Kraftspitzen abgeleitet.

2.3.11 Statistik

Die meisten Daten und Bilder wurden aufgrund der geringen Probenanzahl deskriptiv bzw. qualitativ beschrieben. Im Falle des Tests zur Zellaktivität wurde der Kruskal-Wallis-Test mit *post-hoc* Analyse nach Dunn verwendet. Für Auswertung, Tabellen und Abbildung der Daten wurde *Microsoft Excel* verwendet.

2.3.12 Erstellung von Grafiken und Abbildungen

Zur Erstellung von Tabellen und tabellarischen Abbildungen wurden die Software *Microsoft Excel* und *draw.io* genutzt. Mikroskopische Abbildungen wurden mittels

der Software *Zerene Stacker* als Z-Stack erstellt. Für sämtliche gerenderten Abbildungen wurde *Fusion 360* verwendet. Die elektronische Schaltung wurde mit der Software *Fritzing 0.9.3b* erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung der Scaffolds

3.1.1 Designhierarchie

Der Designprozess erstreckte sich von der ersten Idee über die weitere Entwicklung in unterschiedliche Richtungen (Abbildung 8 und Abbildung 9). Die Namensgebung entstand anhand herausstechender optischer und funktioneller Merkmale. Die drei Design-Studien, die für die Versuche (in Abbildung 8 türkisfarben hinterlegt) ausgewählt wurden, entstammten dieser Designhierarchie. Grob deskriptiv stand am Anfang die Idee eines scheibenförmigen Rasters, das über den Schritt einer Einzelsäule zu einer Kombination eines gelöcherten Rasters weiterentwickelt wurde. Weitere Entwürfe waren zum Beispiel eine schraubenartige Struktur oder eine Art des Rasters mit außenliegenden Flügeln, die ähnlich einem Dübel beim Eindrehen in die Spongiosa abknicken und somit das Scaffold im Defekt verankern sollen. Aufgrund der komplexen und damit zu dichten Bauweise dieser Designs wurden sie für die Betrachtung in dieser Arbeit wieder verworfen.

Die Zwiebel genannte Designstudie ist eine Weiterentwicklung des Rasters. Sie weist eine höhere Oberfläche auf, woraus jedoch auch eine Minderung der Porosität resultiert.

Ein weiterer, sich stärker von seiner Ursprungsidee des Rasters unterscheidender Ansatz ist der Tempel. Das Raster als Grundstruktur besteht hier in einer stark vereinfachten Version nur noch in den einzelnen Säulen des Tempels. Eine detailliertere Beschreibung der Designstudien findet sich in den dazugehörigen Abschnitten 3.1.4 - 3.1.6.

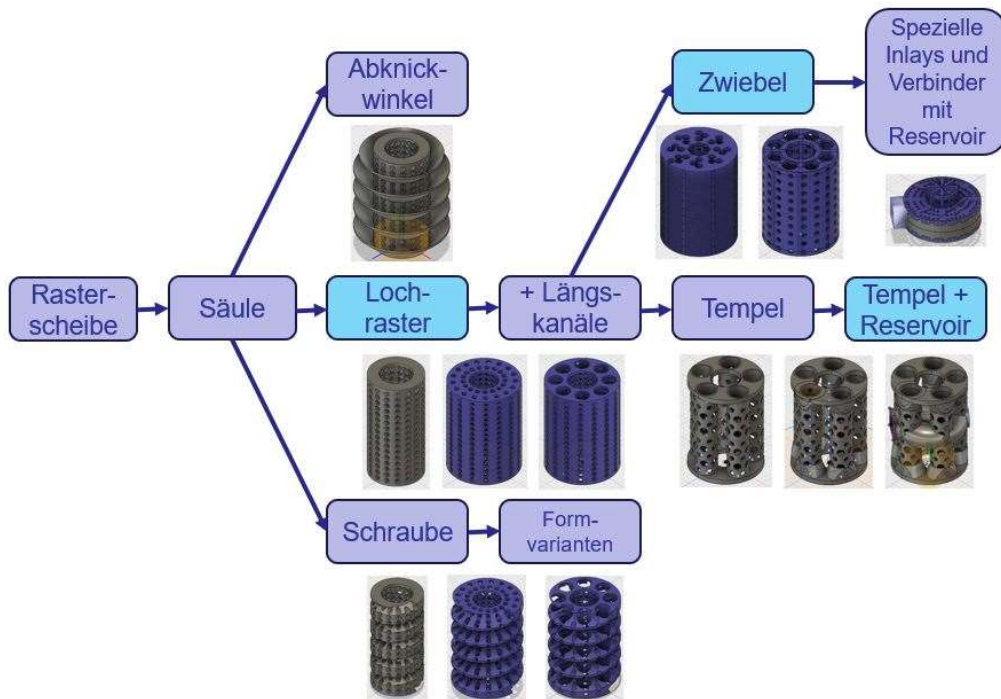


Abbildung 8: Designhierarchie

Überblick über den Weg von der ersten Idee bis hin zu den für die Zellversuche verwendeten Scaffolds (türkis hinterlegt).

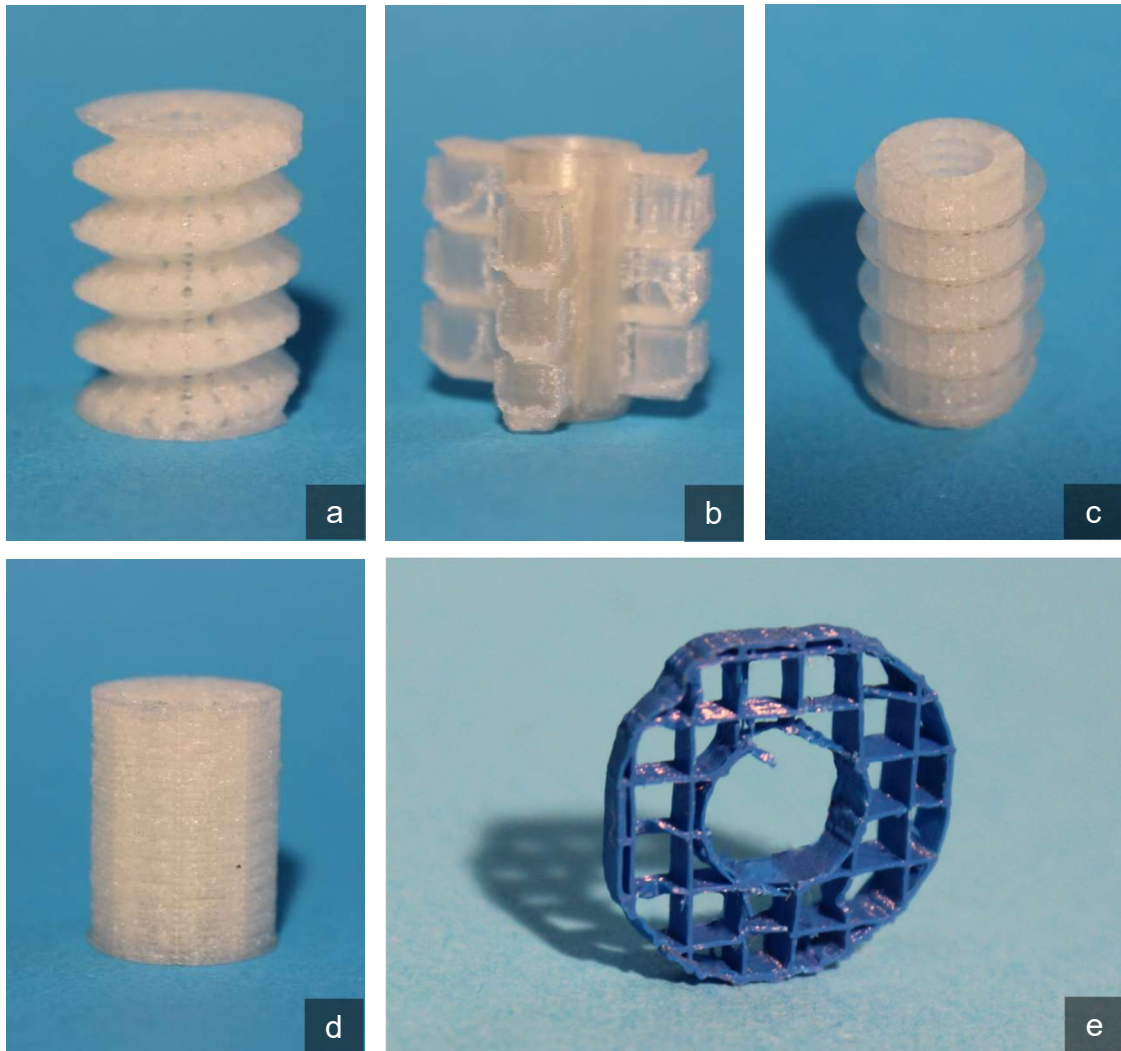


Abbildung 9: Weitere (verworfenne) Designideen

Schraube (a), Flügelraster (b), Abknickwinkelraster (c), Schichtmodell (d), minimalisiertes Raster (e)

3.1.2 Basisparameter der Designstudien

Auch wenn die variablen Parameter wie Durchmesser, Porenanzahl und Höhe später an den Defekt anpassbar sind, fiel die Entscheidung in Hinblick auf die Vergleichbarkeit innerhalb der drei Designstudien zunächst auf einen Durchmesser von 15 mm und eine Höhe von 20 mm. In Abbildung 10 sind die Relationen der verwendeten Modelle erkennbar.

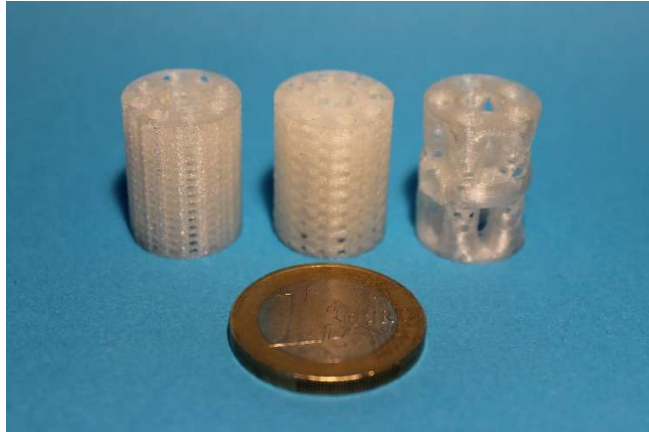


Abbildung 10: Vollmodelle Größenrelation

Der axial verlaufende Mittelkanal aller Modelle weist einen Durchmesser von 6 mm auf. Über diesen können die in Abschnitt 3.1.7 erläuterten Adapter und Zusatzmodule eingesteckt werden. Während die Makrostruktur und Porosität vor allem durch das Hinzufügen von Poren und Kanälen erreicht wird, entsteht eine Mikrostruktur und -porosität hauptsächlich durch die *Layer*-Schichtung des Druckprozesses. Es bilden sich Kavitäten in Längsrichtung. Die größte Tiefenausdehnung dieser Kavitäten liegt im Bereich des Übergangs zweier *Layer*. Weiterhin entstehen zwischen den *Layern* beim Abkühlen Schrumpfungsartefakte mit feiner Rissbildung durch die Volumenverkleinerung des PLA.^{105,96} Auch das während des Druckprozesses entstehende sogenannte *Stringing* (genauer beschrieben in Abschnitt 4.1.2) bewirkt eine Veränderung der Mikrostruktur. Diese Einflüsse auf die Mikrostruktur sind in Abbildung 11 zu sehen.

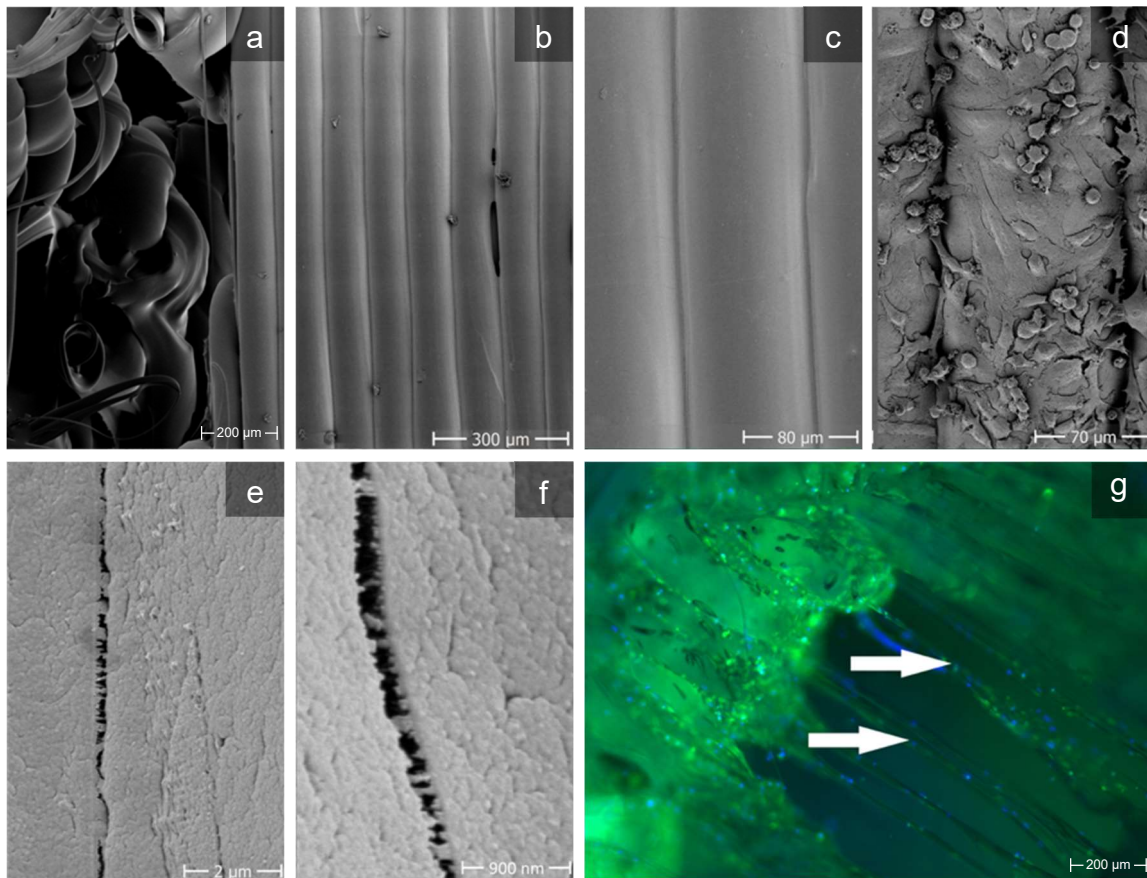


Abbildung 11: Mikrostruktur durch den Druckprozess

Aufsicht auf eine Pore als Überblick (a)

Kavitäten in Längsrichtung (b, c). Die 3D-Beschaffenheit der Oberfläche lässt sich auch im 2D-Bild durch Schattierung und das Einwachsen von Zellen (d) erkennen. Durch Schrumpfung beim Abkühlen entstehen interlaminäre Risse (e, f). Z-Stack-Komposit-Aufnahme aus Epifluoreszenz mit FITC und DAPI-Filter mit angelegter 50-facher Vergrößerung (g): Die Aufsicht auf eine zellbesiedelte Pore mit *Stringing* durch Materialnachlaufen während des Drucks (weiße Pfeile).

Die einzelnen Modelle weisen unterschiedliche Werte bezüglich Oberfläche, Volumen, Oberflächen-Volumen-Quotient und Masse auf (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Basisparameter der verschiedenen Designstudien

	Oberfläche [mm²]	Volumen [mm³]	A/V-Verhältnis [Oberfläche/Volumen]	Masse [g]
Raster	4454,96	1243,63	3,58	1,249 ± 0,035
Zwiebel	7054,6	1203,77	5,86	1,001 ± 0,019
Tempel	4438,89	796,93	5,58	0,760 ± 0,028

Der gesamte Designprozess unterliegt einem weiteren Entwicklungsprozess und ist als *Proof of Concept* einer FFF-3D-druckbaren Makrostruktur mit Integration funktioneller Untereinheiten zu sehen.

3.1.3 Druckparameter und Realisierung

Die Realisierung der Scaffolds erfolgte mit dem bereits zuvor beschriebenen modifizierten 3D-Druckermodell ANET A6. Eine Auswahl einiger wichtiger Druckparameter ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Basisdruckparameter

Parameter	Wert
Drucktemperatur	200 °C
Heizbetttemperatur	50 °C
<i>Layer</i> -Breite	200 µm
<i>Layer</i> -Höhe	100 µm
Basisgeschwindigkeit	40 mm/s
Bauteilkühlung ab Höhe	500 µm
Retraktionsdistanz	3,4 mm
Retraktionsgeschwindigkeit	45 mm/s

3.1.4 Designstudie Raster

Das Raster entstand als erster Designentwurf. Ziel dieses Entwurfes sollte das Einbetten einer offenen Grundstruktur in einen mechanisch stabilen Rahmen sein. Die funktionellen Untereinheiten des Rasters sind die außenliegenden axialen Kanäle mit einem Durchmesser von 3 mm. Der Entwurf wird radiär von Poren von 1 mm Durchmesser, die um 360° um das Modell verteilt sind, durchstoßen. Dies ermöglicht neben der Volumenreduktion die Erhöhung der Diffusionsoffenheit. Länge und Durchmesser des Rasters lassen sich anpassen, wodurch sowohl die Anzahl der Längskanäle als auch der Poren variiert. Der zentrale axiale Mittelkanal mit 6 mm Durchmesser dient dem Hinzufügen weiterer Funktionen mittels verschiedener Adapter. Für die Genexpressionsversuche und Alizarin-Färbung wurden Scheiben von 5 mm Höhe verwendet. Abbildung 12 zeigt eine Übersicht, das Schnittmodell und die Bemaßung in einer Konstruktionszeichnung. Abbildung 13 zeigt das realisierte Modell.

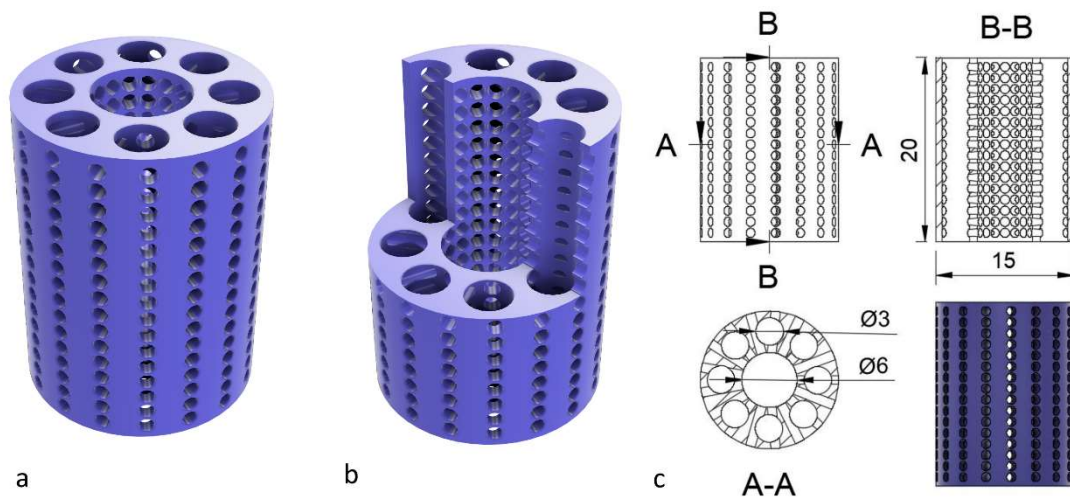


Abbildung 12:

Designstudie Raster im Überblick (a), Schnittbild (b) und Konstruktionszeichnung (c) mit Bemaßung in mm

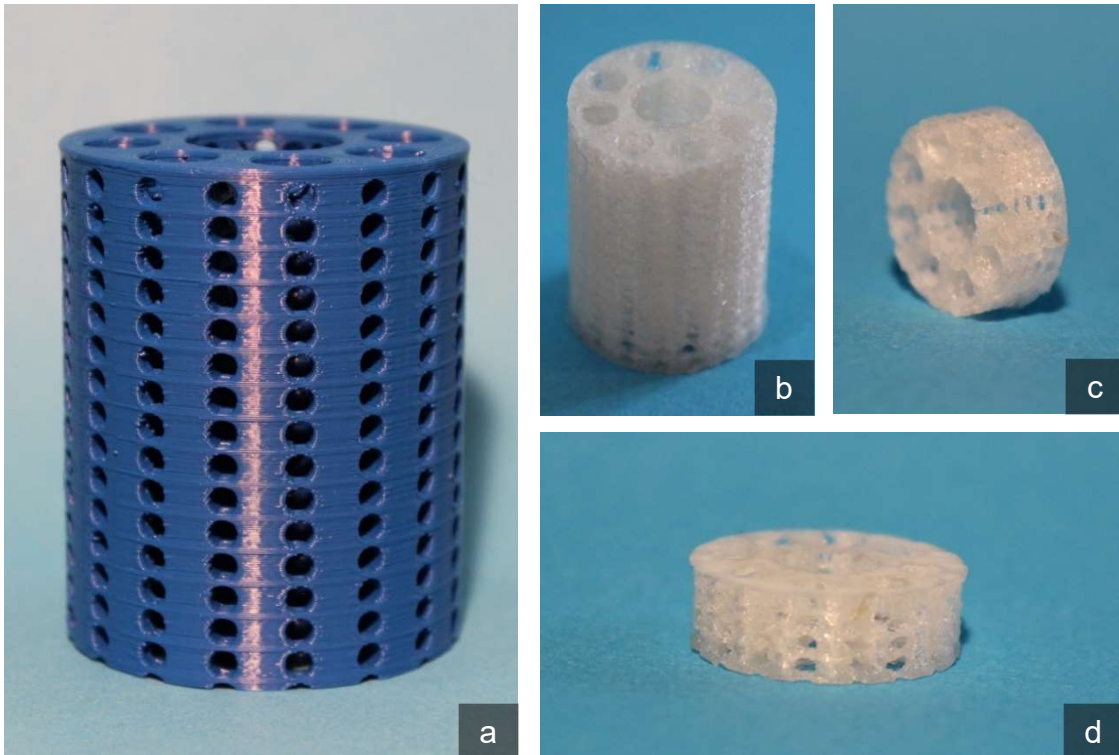


Abbildung 13:

Realisiertes Raster als hochskaliertes Modell für Fotos (a), Vollmodell (b) und als Rasterscheibe in 5 mm Höhe (c, d)

3.1.5 Designstudie Tempel

Der Tempel besteht aus verschiedenen Grundstrukturen, die zu einem übergeordneten Design zusammengesetzt sind. Die Untereinheiten bilden die Säulen. Sie sind über zwei Sockel-Ring-Strukturen an den jeweiligen Enden untereinander verbunden. So wird eine funktionelle sowie mechanisch zusammenhängende Einheit gebildet. Der Innendurchmesser der Säulen beträgt 3,9 mm, der Außendurchmesser 4,5 mm. Poren mit den Durchmessern 1 mm und 1,5 mm sollen durch Vergrößern der Öffnungsfläche die Diffusion auch in die inneren Bereiche erleichtern und sind ein wichtiger Faktor der Makrostruktur. Der Durchmesser und die Länge des Tempels sind über die Anzahl und - in gewissen Grenzen - auch Länge der Einzelsäulen variabel. In der Mitte des Tempels wurde neben einem hexagonal vertieften Adapteranschlusses auch eine Reservoir-Einheit integriert. Die Länge kann auch durch Aneinanderstecken mehrerer einzelner Tempel variiert werden.

Die funktionellen Untereinheiten, die für die Genexpressionsversuche und Alizarin-Färbung genutzt wurden, bestand aus einer umseits geschlossenen Einzelsäule mit Poren. In Abbildung 14 ist der Tempel bebildert und in Konstruktionszeichnungen dargestellt. Abbildung 15 zeigt das realisierte Modell.

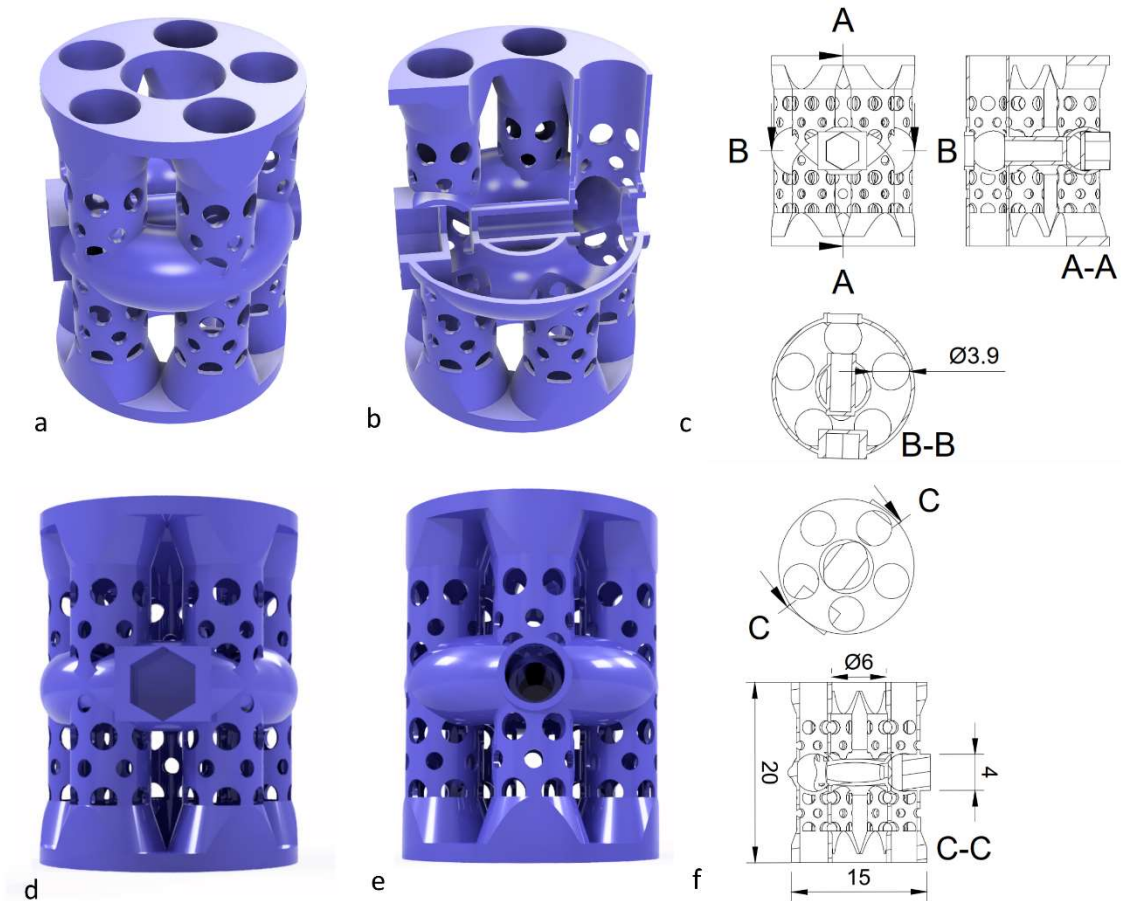


Abbildung 14:

Designstudie Tempel als Aufsicht (a). Schnittbild der oberen Hälfte (b): Mittig ist die angeschnittene Reservoirereinheit erkennbar. Rechts im Bild findet sich der Zugang zu dieser, während sich links eine hexagonale Anschlussmöglichkeit bietet. Konstruktionszeichnung mit Bemaßung in mm (c, f). Ansicht von vorne auf den hexagonalen Anschluss (d) und von hinten auf den Befüllungszugang des Reservoirs (e).



Abbildung 15:
 Realisierter Tempel als Vollmodell (a, b), hochskaliertes Modell für Fotos (c)
 und Einzelsäule (d, e)

3.1.6 Designstudie Zwiebel

Die Designstudie Zwiebel folgt einer ähnlichen Struktur wie das Raster. Das Ziel einer weiteren Oberflächenvergrößerung und Querstabilitätsverbesserung wurde durch Hinzufügen konzentrischer Ringe, wie in Abbildung 16 sichtbar, erreicht. Hierfür wurde auch der Zentralkanal in diese Ringstruktur eingebettet und ist nur noch in den oberen und unteren 5 mm vollständig vorhanden, sodass die Adapter weiter verwendbar sind. Die Designstudie Zwiebel wird ähnlich wie das Raster von 1 mm messenden Poren von zentral nach radial durchstoßen.

Für die Genexpressionsversuche und die Alizarin-Färbung wurden Scheiben von 5 mm Höhe verwendet. Abbildung 17 zeigt das realisierte Modell.

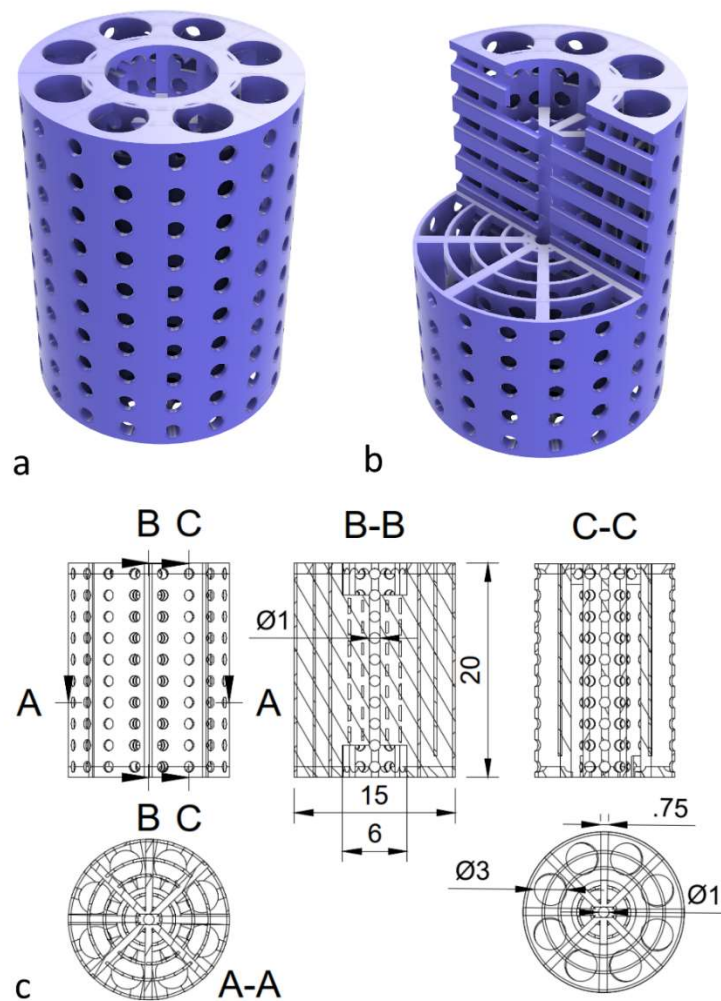


Abbildung 16:

Designstudie Zwiebel als Übersicht (a), Schnittbild (b) und Konstruktionszeichnungen (c) mit Bemaßung in mm



Abbildung 17:

Realisierte Zwiebel als Übersicht im Vollmodell (a, b), Aufsicht (c) und Seitenansicht (d) auf eine 5 mm starke Zwiebelscheibe

3.1.7 Entwicklung Baukastensystem und Funktionsadapter

Ein weiterer innovativer Ansatz stellte die Einführung eines Baukastensystems dar. Hierzu sollen die Modelle untereinander kombinierbar und um weitere Funktionen ergänzbar sein. Die Aufnahme der Adapter gelingt als Übergangspassung über den mittigen Kanal. Das Höchstmaß des Adapters und das Mindestmaß des Kanals sind identisch. Detailbilder der Adapteraufnahmen der drei gewählten Modelle sind in Abbildung 18 gezeigt.

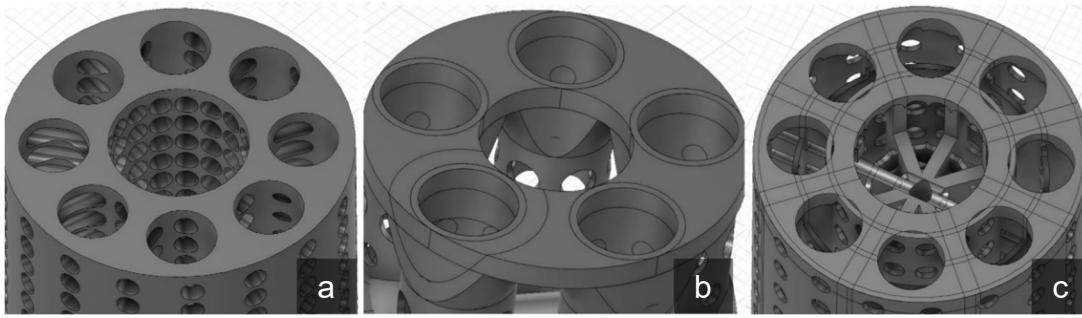


Abbildung 18:
Adapterregion im Detail jeweils im Modell Raster (a), Tempel (b) und Zwiebel (c)

Die Adapter wurden bisher nicht umfassend getestet und stellen lediglich erste realisierte Entwürfe dar. Eine Auswahl ist im Folgenden und in Abbildung 19 dargestellt.

Ein Kombinationsadapter ermöglicht die Verbindung zweier - auch unterschiedlicher - Designs in Längsrichtung. Die Ausführung sollte bei geringem Volumen eine mechanisch ausreichend stabile Verankerung ermöglichen. Aus diesem Grund wurden der Passung noch jeweils drei Verankerungszinken hinzugefügt.

Der Verankerungskopf kann am Ende des Scaffolds eingesetzt werden und läuft zur Spitze hin konisch zu. Über die gewindeähnliche Außenseite soll sich das Scaffolds so in den Defektrand eindrehen lassen und eine stabilere Verankerung ermöglichen.

Lediglich der Tempel besitzt innerhalb des Designs ein Reservoirsystem. Um ein solches auch den anderen Designstudien hinzuzufügen, wurden Reservoirsysteme auf steckbarer Basis entwickelt.

Um die Oberfläche weiter zu vergrößern und falls der zentrale Kanal nicht gewünscht ist, kann ein Oberflächenvergrößerungs-*Inlay* eingeschoben werden.

Eine weitere Idee ist der Einsatz sogenannter Komposit-Filamente. Auch wenn sich diese Arbeit noch nicht explizit mit diesen beschäftigt, wurde auf Basis des Proto-Pasta Composite PLA *Magnetic Iron* ein Bauteil mit ferromagnetischen Eigenschaften gedruckt.



Abbildung 19: Adaptersystem Bauteile

Von links nach rechts: Oberflächenvergrößerungs-*Inlay*, Kombinationsadapter, Verankerungskopf (a, b).

Zusatzadapter Reservoir mit Hexagonal-Anschluss vorne (c) und hinten (d).

Herunterskalierte Adapter mit Verbindung einzelner Bauteile und Bohrkopf (e).

Verwendung eines Komposit-Materials mit ferromagnetischen Eigenschaften (f).

3.2 Desinfektion

Auf Basis der in Tabelle 6 gezeigten Ergebnisse wurde eine optimale Desinfektionsdauer zur Vermeidung von kontaminierendem Wachstum von 10 min festgelegt. Eine makro- sowie mikroskopisch sichtbare Veränderung des PLA-Gerüsts der Scaffolds durch Ethanol (70 % vol) konnte nicht festgestellt werden.

Tabelle 6: Desinfektionstest – Ermittlung der Desinfektionsdauer

Tag (d)	Unbehandelte Teststücke	5 min Desinfektion	10 min Desinfektion	20 min Desinfek- tion
1	Leichte Trübung, Beginnende Gelbfä- bung des Mediums	Keine Verän- derung	Keine Verän- derung	Keine Verän- derung
2	Eindeutige Trübung und Schlierenbildung, Weitere Gelbfärbung			
3	Starke Schlierenbildung mit Trübung, Starke Geruchsbildung			
4	Säulen ab hier aufgrund wachsender Kontamina- tion verworfen			
5				
6				
7		Wachstum ei- nes Pilzmy- zels		

3.3 Zelladhäsion

Die beschichteten Designstudien wurden mit Saos-2-Zellen besiedelt und mit CFSE sowie DAPI gefärbt. Abbildung 20 zeigt Bilder der unterschiedlichen Designstudien. Die Zelladhäsion von Saos-2-Zellen wird durch die Beschichtung mit CellTak deutlich verbessert.

Viele Zellen befinden sich in den Vertiefungen der *Layer* sowie auf dem durch *Stringing* entstandenen Fasergeflecht (siehe Abschnitt 4.1.2) innerhalb der *Travel*-Bewegungen des Druckkopfes.

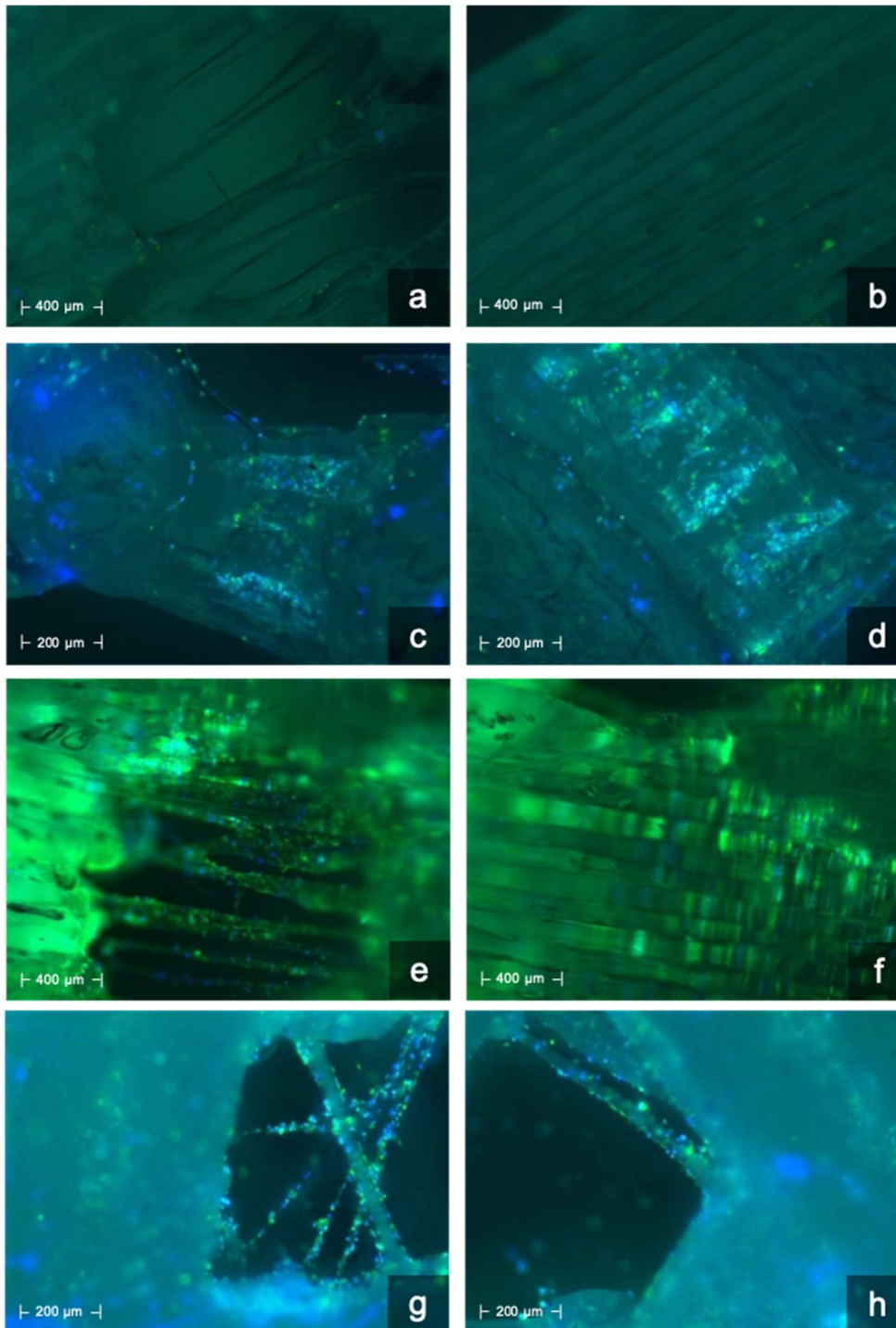


Abbildung 20: CFSE-DAPI-Färbung; Efluoreszenz

Besiedeltes, aber unbeschichtetes Scaffold (a, b). Besiedeltes und mit CellTak beschichtetes Raster (c), Tempel (e) und Zwiebel (g) in Aufsicht auf eine Pore, und mit Blick auf die Außenwandung (Raster (d), Tempel (f), Zwiebel (h)). DAPI-gefärbte Zellkerne (blau) und CFSE-gefärbte Zellen (grün)

Die REM-Aufnahmen zeigen ein ähnliches Bild (Abbildung 21). Im Vergleich zwischen der unbesiedelten und der besiedelten Oberfläche sieht man ein dichtes Zellgeflecht mit Wachstum bis in die *Layer*-Vertiefungen und eine teilweise Überbrückung dieser. Unter osteogener Differenzierung ist zusätzlich eine auf der PLA-Oberfläche abgeschiedene Substanz zu erkennen.

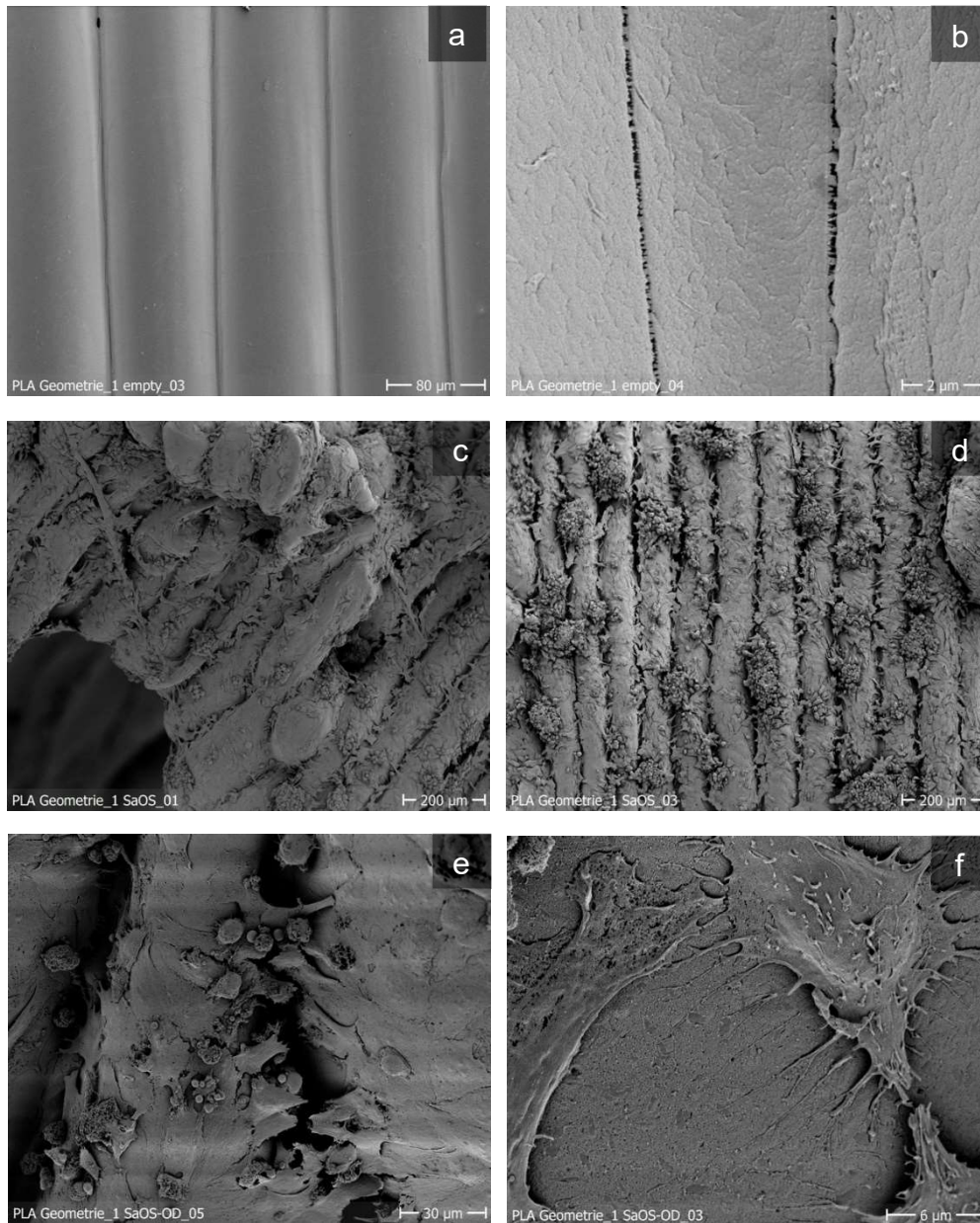


Abbildung 21: Adhäsion auf den Scaffolds unter dem REM

Unbesiedeltes Scaffold (a, b). Besiedeltes Scaffold unter Standard-Medium (c, d) mit Blick auf Pore (c) und Außenwand (d): Deutlich sind die bis in die *Layer*-Vertiefungen wachsenden Zellen erkennbar. Besiedeltes Scaffold unter Osteogenem Medium (e, f). Detailaufnahme (f): Erkennbar ist in der Umgebung des Zelleibs eine auf der Oberfläche des Scaffolds abgeschiedene Substanz.

3.4 Zellaktivität

Die Zellaktivitätslevel sind in Abbildung 22 dargestellt. Zu Beginn des Versuchs, am ersten Tag nach der Aussaat, waren beim Raster die höchsten Ausgangswerte zu verzeichnen. Auch im Verlauf zeigten sich hier höhere Werte als bei Zwiebel und Tempel. Während bei Modell Zwiebel ab Tag 7 ein Plateau erreicht wurde, stiegen die Zellaktivitätslevel der Modelle Tempel und Raster bis Tag 21. Mit den Aktivitätsleveln unter osteogener Differenzierung der Zellen befasst sich der nächste Abschnitt.

Im makroskopischen Bild sind die durch das violette Formazan vollständig eingefärbten Scaffolds gut sichtbar (Abbildung 23).

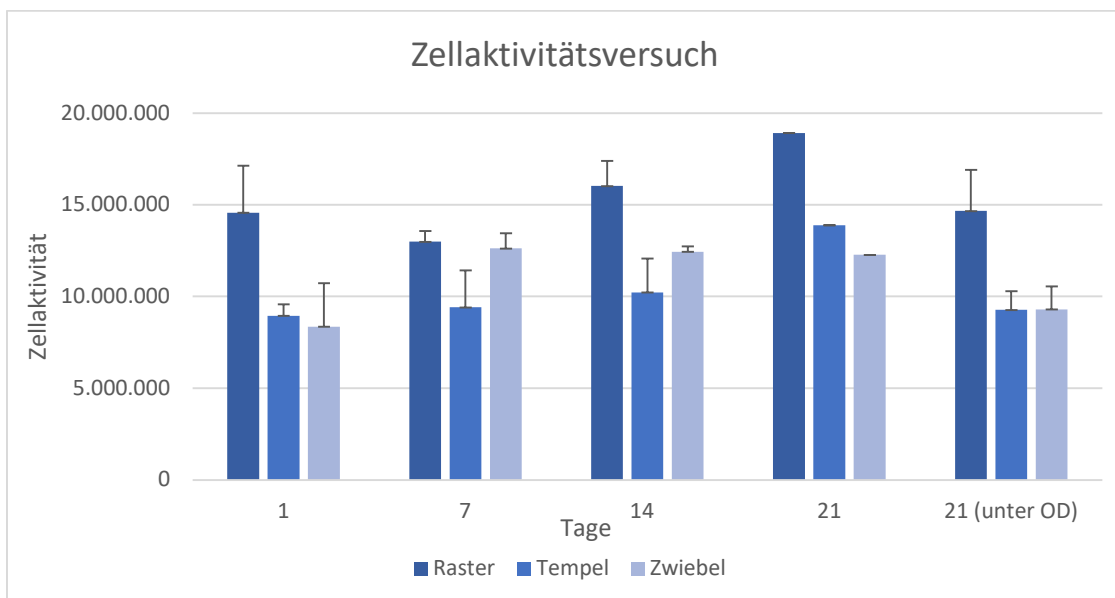


Abbildung 22: Zellaktivitätsversuch mittels des MTT-Tests

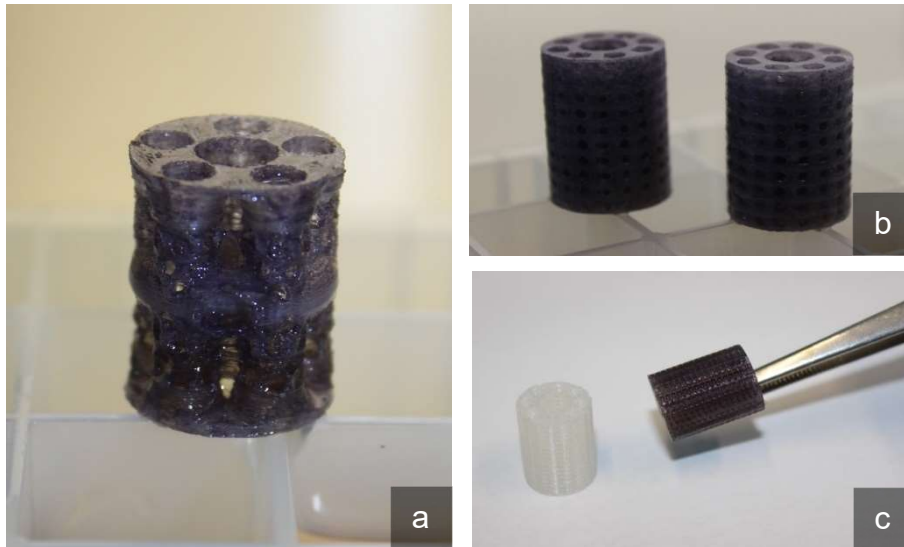


Abbildung 23: Makroskopisches Bild der MTT-Testmodelle
 Durch Formazan eingefärbte Modelle Tempel (a), Zwiebel (b)
 und Raster (c).

3.5 Osteogene Differenzierung

3.5.1 Zellaktivität unter Osteogener Differenzierung

Unter osteogener Differenzierung zeigten sich im direkten Vergleich bei sämtlichen Modellen am Tag 21 niedrigere Zellaktivitätswerte als am gleichen Tag nach Inkubation in Standard-Medium. Die höchsten Zellaktivitätslevel am Tag 21 fanden sich auch unter osteogener Differenzierung bei dem besiedelten Raster (Abbildung 22).

3.5.2 Alizarin-Rot-Färbung

Bereits makroskopisch lässt sich, trotz leichter Einfärbung der Scaffolds selbst, ein Unterschied zwischen Scaffolds in Standard-, bzw. Osteogenem Medium erkennen (Raster in Abbildung 24, Tempel in Abbildung 25, Zwiebel in Abbildung 26). Die Rotfärbung der Calciumablagerungen durch Alizarin zeigt sich makroskopisch sowie unter dem Mikroskop vor allem in den Bereichen der axialen Kanäle und radialen Poren und weniger auf den Freiflächen. Dies deckt sich mit dem gezeigten Hauptwachstum der Zellen in den Poren und auf dem *Stringing* der Scaffolds unter CFSE-DAPI-Färbung.

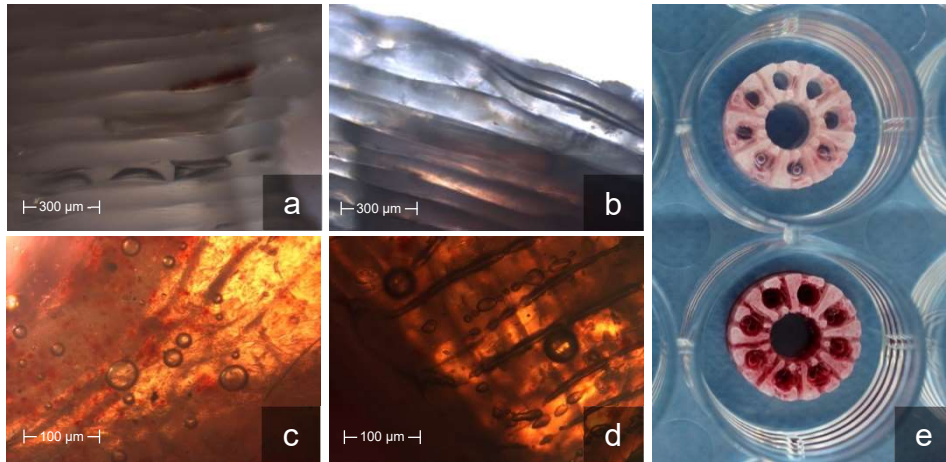


Abbildung 24: Alizarin-Färbung Raster

Besiedelung unter Verwendung von Standard-Medium (a, b). Besiedelung unter Osteogenem Medium (c, d): Erkennbare starke Streuung von rotem Licht im Well. Besiedelung unter Standard-Medium oben und unter Osteogenem Medium unten (e): Makroskopisch sichtbare Unterschiede.

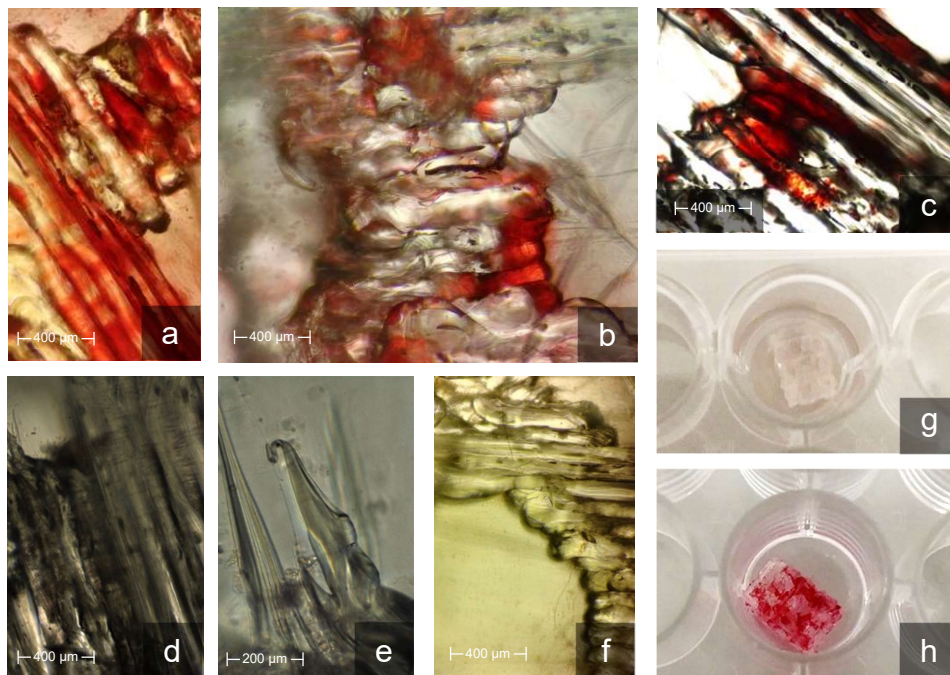


Abbildung 25: Alizarin-Färbung Tempel

Durch Alizarin angefärbte Calciumablagerungen unter Osteogenem Medium (a, b, c). Scaffold mit Besiedelung unter Standard-Medium (d, e, f). Makroskopische Übersicht unter Standard- (g) und Osteogenem Medium (h)

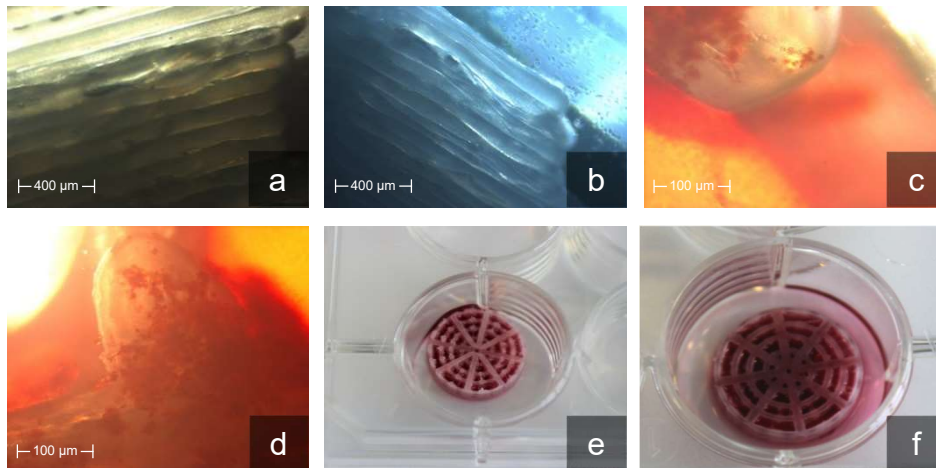


Abbildung 26: Alizarin-Färbung Zwiebel

Scaffold mit Besiedelung unter Standard-Medium (a, b). Durch Alizarin angefärbte Calciumablagerungen unter Osteogenem Medium (c, d): Erkennbare Streuung von rotem Licht im Wellenbereich. Makroskopische Übersicht unter Standard- (e) und Osteogenem Medium (f): Vor allem in den inneren Bereichen der Zwiebel konnte die Färbelösung nur schlecht herausgewaschen werden.

3.5.3 Genexpressionsanalyse

Die Genexpressionsanalyse erfolgte nach 21 Tagen der Kultivierung. Die Daten wurden mithilfe der bereits beschriebenen Livak-Methode ausgewertet und sind in Abbildung 27 dargestellt. Es zeigte sich bei der Zwiebel eine deutliche Erhöhung der Genexpression von *collagen-1 alpha* sowie Osteocalcin und auch der Alkalischen Phosphatase. Der Tempel zeigt eine Erhöhung der Expression des Gens für *collagen-1 alpha* und der Alkalischen Phosphatase. Beim Modell Raster war keine vermehrte Genexpression nachweisbar.

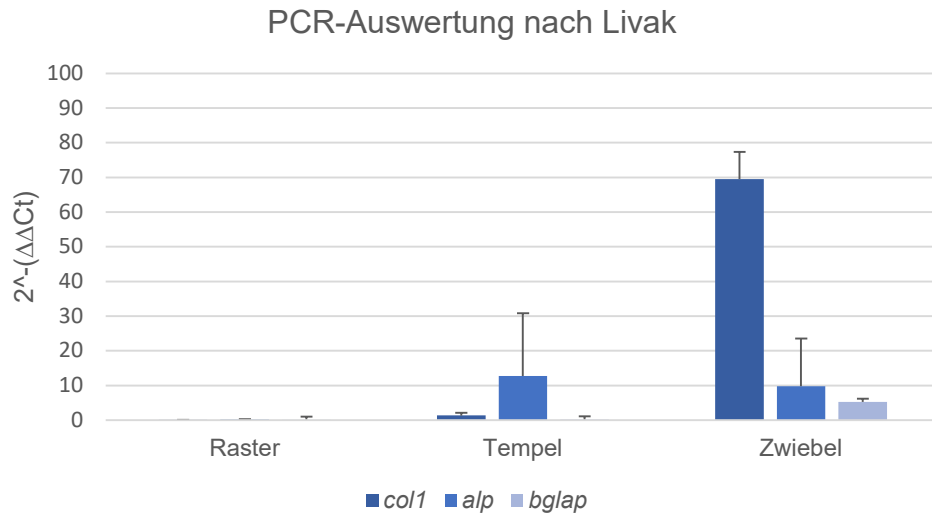


Abbildung 27: PCR-Auswertung nach Livak

3.6 Mechanische Evaluation

Wie bereits beschrieben, wurde im ersten Schritt der Bereich des Versagens definiert, in dem das Scaffold sich nicht zurück in die Ausgangslage ausdehnt, bzw. dem Druckstempel nicht mehr den Ausgangswert in Form einer Kraft entgegenzusetzen kann. Für das Raster und die Zwiebel liegt dieser Bereich zwischen 2 mm und 2,5 mm, für den Tempel bei ca. 2 mm. Die zugehörigen Kurven zeigt Abbildung 28.

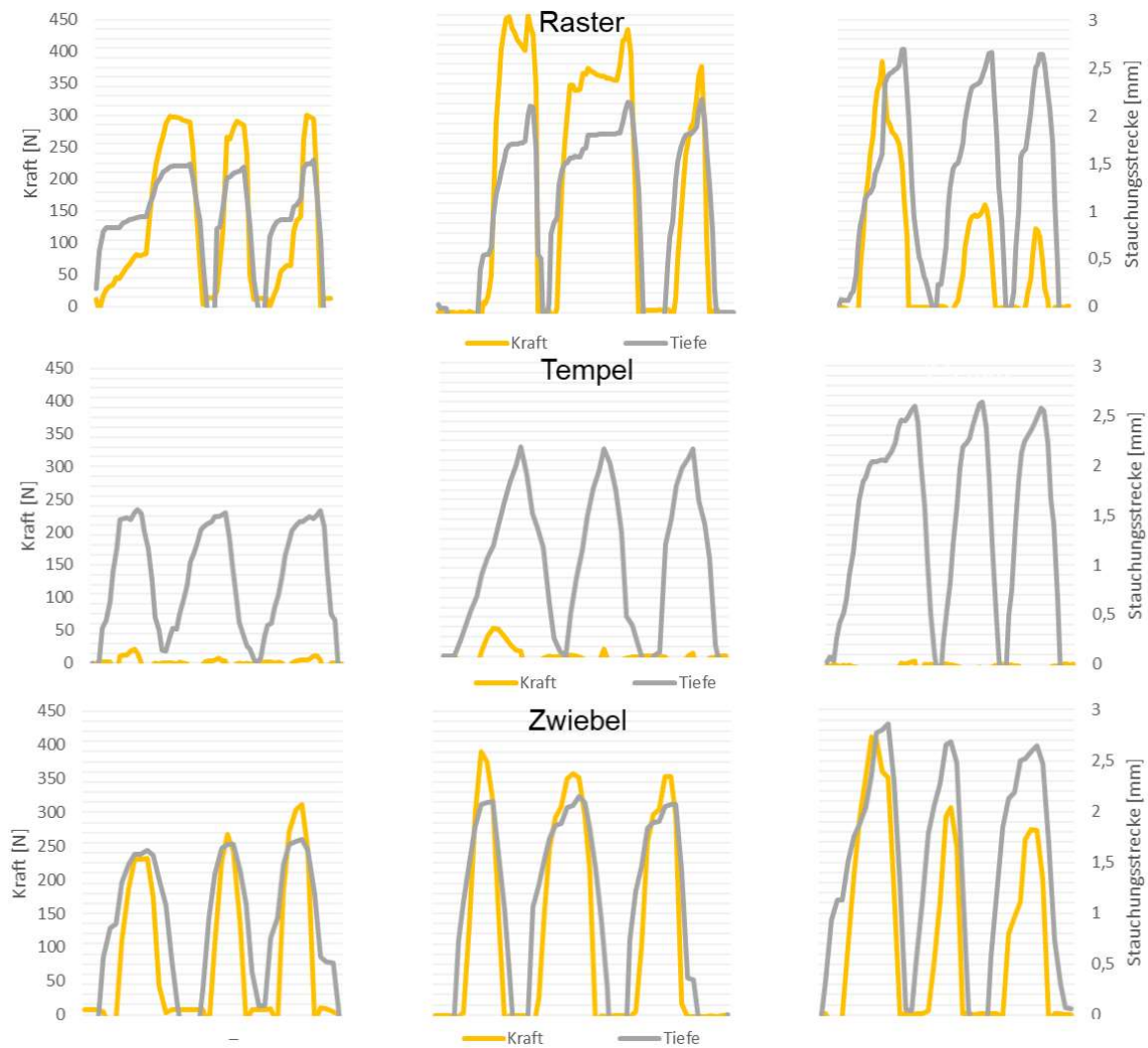


Abbildung 28: Stauungsstrecke, bei der es zum Versagen kommt

Die Graphen zeigen die dreimalig auf die Scaffolds wirkende Kraft (gelb) bei 1,5 mm, 2 mm und 2,5 mm Stauungsstrecke (grau).

In diesem Bereich der Stauungsstrecke war nun im nächsten Schritt der Bruch zu erwarten. Der Druckstempel wurde in das Scaffold hineingepresst und dabei die Stauungsstrecke gegenüber der aufzuwendenden Kraft abgeleitet. Die hierdurch erstellten Kraftkurven zeigen ähnliche Charakteristika. Das Raster zeigt mehrere Kraftspitzen und die Zwiebel ein Kraftplateau mit nur leichter Veränderung der Kraft über den Stauungsverlauf bis zum Versagen. Der Tempel hingegen widerstand den entgegengebrachten Kräften nur in geringem Maße. Als Maximum wurde bei den einzelnen Scaffolds jene Kraftspitze gewählt, die im vorher festgelegten Stauungsbereich des Versagens lag.

Die Scaffolds versagten bei folgenden Maximalkräften: Der Tempel kann mit 87 N die geringste Druckbelastung aufnehmen. Raster und Zwiebel hingegen zeigten mit 514 N und 463 N höhere Werte. Das Aussehen der Scaffolds nach axialer Stauchung ist in Abbildung 29 gezeigt.

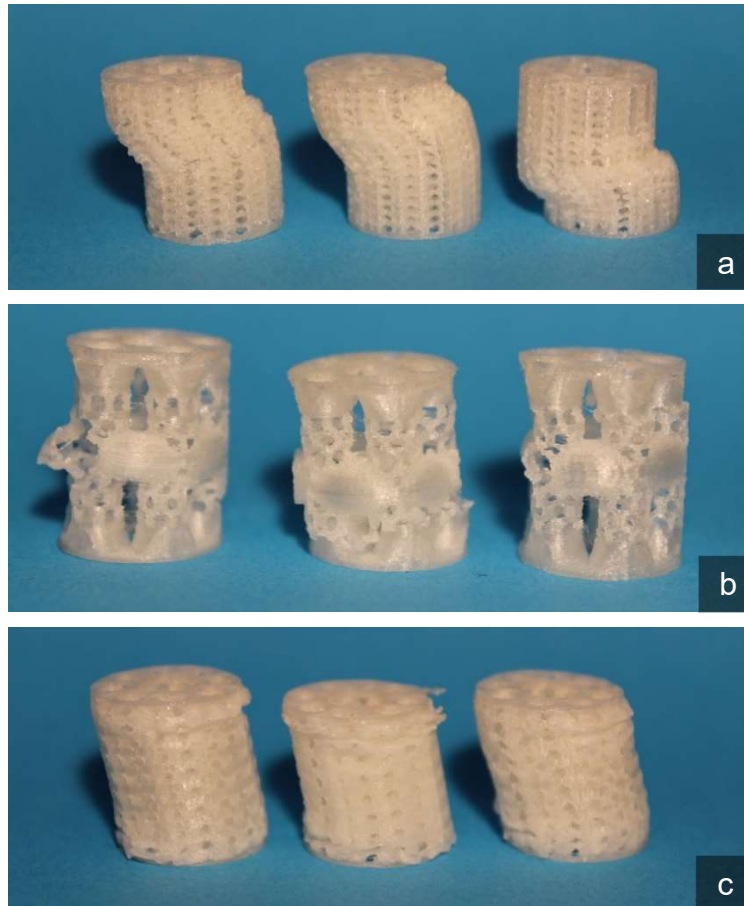


Abbildung 29: Modelle nach Stauchung
Raster (a), Tempel (b), Zwiebel (c) nach Stauchung:
Es zeigen sich jeweils in den gleichen Designs ähnliche Bruch- und damit Schwachstellen innerhalb des Modells.

4 Diskussion

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung und Realisierung eines skalierbaren Modells zum Einsatz als individuell 3D-druckbares Knochenersatzdesign auf der Basis von PLA bei CSD. Die Designs sollen den bisherigen Goldstandard der Beckenkammtransplantation ergänzen, bzw. einen alternativen Ansatz hierzu bieten.

Das Hauptaugenmerk bei der Entwicklung lag primär auf einer offenporigen Grundstruktur und nur sekundär auf der mechanischen Stabilität. Weiterhin wurde versucht, die Modelle im späteren Einsatz an den Knochendefekt individuell anpassbar zu halten, um auf ein direktes Hochskalieren zu verzichten. Hierzu entstand auch ein optionales Baukastensystem, das unter anderem Funktionsadapter wie beispielweise Verankerungssysteme enthält. Die *in vitro* Versuche zur Zellbesiedelung und osteogenen Aktivität von Saos-2-Zellen bestätigten ein mögliches Wachstum und die Differenzierung auf der 3D-gedruckten PLA-Oberfläche.

4.1 Designentwicklung

Ein ideales Scaffold muss sämtliche aufgeführten Anforderungen erfüllen und damit die einzelnen Phasen der Knochenheilung optimal unterstützen. Dabei darf Leijten et al. (2015) zufolge der Entwurf weder zu einfach, noch zu komplex sein.¹¹

Verwendet wurde *Fusion 360*, um die Designs anpassbar zu halten und einfach Veränderungen hinzufügen zu können. So lassen sich einzelne Bestandteile freistellen oder in der Anzahl variieren. Dies gewährleistet die spätere Anpassbarkeit. Auch lassen sich die Oberflächen- und Volumenberechnungen leicht durchführen, um so die Waage zwischen Komplexität und Einfachheit zu halten.

Wie bereits definiert war das Ziel, neue Designs für die Nutzung als Knochenersatzmaterial zu entwickeln, welche funktionelle Kleinstrukturen in einer Großstruktur kombinieren. Dies bedeutet, die durch den FFF-3D-Druck erzeugte Mikrostruktur zu nutzen und in eine funktionelle Untereinheit einzubetten. Die funktionellen Untereinheiten werden wiederum in einem Rahmen verankert. Zu dieser

Rahmenstruktur können dann weitere Funktionen wie ein Reservoir hinzugefügt werden. Dieser modulare und hierarchische Aufbau soll die spätere Anpassbarkeit gewährleisten. Übersichtsweise zu sehen ist diese Idee in Abbildung 30.

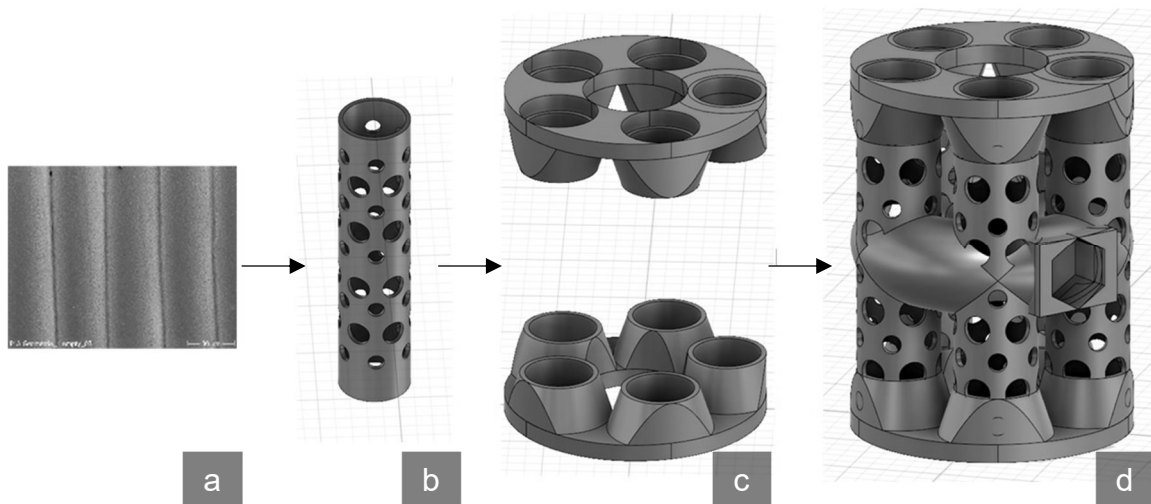


Abbildung 30: Konzeptaufbau der modularen Hierarchie

Modulare Hierarchie: Von der Mikrostruktur (a) über die funktionelle Untereinheit (b) mit Einbettung in eine rigide Rahmenstruktur (c) hin zum kompletten Modell mit weiteren Funktionen (d).

Einen ungefähren Überblick über die offene Struktur eines Scaffolds kann dessen Oberflächen-Volumen-Verhältnis bieten. Die Basiswerte der drei Scaffolds sind in Tabelle 4 dargestellt. Auch wenn nicht direkt mit optimalerem Zellwachstum gleichzusetzen, ermöglicht ein hohes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen vergleichsweise viel Besiedelungsfläche. Die Werte wurden in *Fusion 360* berechnet, wobei von einer glatten Oberfläche ausgegangen und die *Layer*-Schichtung nicht miteinbezogen wurde. Die tatsächliche Oberfläche weist also einen größeren Wert auf.

4.1.1 Makrostruktur

Die erste Frakturheilungsphase ist nach dem Defekt vor allem durch die Ausbildung eines Hämatoms geprägt. Hier spielt die Versorgung mit Sauerstoff und

Nährstoffen eine wichtige Rolle.^{89,106,107} Dieses Hämatom dient zum einen als Leitschiene für den notwendigen Einstrom von Makrophagen und Stammzellen zur Initiierung der Knochenheilung. Zum anderen limitiert das Hämatom aber auch die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung, da eine Vaskularisierung erst im Verlauf stattfindet.^{89,106,107} Unter Kontakt mit dem Fremdkörpermaterial des Scaffolds wird die Gerinnungskaskade initiiert und die Nährstoffversorgung weiter verschlechtert.¹⁰⁸ Um die Zellen in den weniger versorgten zentralen Bereichen des Scaffolds zu versorgen, müssen entweder kurze Diffusionsstrecken oder hohe Diffusionsgradienten vorliegen. Letztere sind *in vitro* nur begrenzt zu verändern. Deshalb ist es Aufgabe des Scaffold-Designs, die spätere Diffusionsstrecke möglichst kurz zu halten, um so ein Absterben der immigrierten Zellen zu verhindern.^{89,107,109} Unter diesem Hintergrund ist es nicht verwunderlich, dass ein größerer Porendurchmesser und eine große Interkonnektivität der Makrostruktur das Knochenwachstum entscheidend verbessern.^{29,110} Verschlechtert wird dieses Versorgungsproblem noch beim einfachen Hochskalieren solcher Scaffolds, da sich zwar ebenfalls der Porendurchmesser vergrößert, aber die Diffusionsstrecke zum weiter limitierenden Faktor wird.

Die Entwürfe bieten einen Ansatz, der innerhalb der Makrostruktur eine ausreichende Porengröße vereint und dennoch nicht gänzlich auf mechanische Stabilität verzichtet, wie es teilweise in anderen Arbeiten befürchtet wird.⁵⁶ Außerdem sollten die Designstudien nicht durch einfaches Hochskalieren in der Größe, sondern durch das Hinzufügen funktioneller Subeinheiten mit eigener Porenstruktur in Durchmesser und Länge verändert werden. Gleichzeitig sollte die Maßgabe die Entwicklung einer einfachen und nicht zu komplexen Grundstruktur sein. Aus diesem Grund wurden die Entwürfe der Schraube und des mit Abknickwinkeln versehenen Rasters wieder verworfen.

4.1.2 Mikrostruktur

Im Gegensatz zur eben beschriebenen Makrostruktur dient die Mikrostruktur vor allem der initial besseren Zellanhaftung und -verbreitung. Diese entsteht hauptsächlich durch den Druckprozess selbst. So zeigte sich in den Versuchen, dass die Anhaftung auf der reinen PLA-Oberfläche durch Saos-2-Zellen jedoch nur

schwach ausgeprägt ist (siehe Abschnitt 3.3). Nach Beschichtung mit CellTak zeigten die Zellen Bereiche vermehrter Ansiedelung: In den *Layer*-Vertiefungen, den Poren, und auf den durch das sog. *Stringing* entstandenen Fäden. *Stringing* ist ein beim 3D-Druck eher unerwünschtes Phänomen. Es werden feine Materialfäden durch ein Nachlaufen von Filament und Filament-Überschuss an der Düsenspitze gezogen. Wie die Ergebnisse zeigen konnten, bieten diese Fäden für die Zellanhaftung gute Bedingungen. Die gezielte Implementierung als weitere Hierarchieebene sollte Gegenstand weiterer Forschung sein. Auch die Kavitäten bieten gute Zellanhaftungs- und -überlebensbedingungen.¹¹¹ Sie entstehen während des Druckprozesses in Längsrichtung der *Layer* und sind in den rasterelektronenmikroskopischen Bildern (Abbildung 11) gut zu erkennen.

Viele thermoplastische Polymere besitzen die Eigenschaft beim Abkühlen zu schrumpfen.^{96,105} Im Falle von PLA geschieht dieser Schrumpfungsprozess vor allem vom Übergang der Glasübergangstemperatur von etwa 60 °C zu Raumtemperatur.⁹⁶ Diesen Prozess durchlaufen auch die einzelnen unterschiedlich heißen Kunststoffschichten des FFF-3D-Druckprozesses, die zudem ungleichmäßig abkühlen. Das Elastizitätsmodul (kurz E-Modul, oder Young-Modul) beschreibt den Zusammenhang von Spannung und Dehnung bei der Verformung eines festen Körpers aus einem bestimmten Material. Ein höheres E-Modul beschreibt ein steiferes Material. Im Bereich des aufgeschmolzenen Kunststoffes sinkt die Viskosität und das PLA ist weniger steif. Die Viskosität im bereits erkalten Randbereich und den vorherigen *Layern*, sowie das E-Modul nähert sich jedoch wieder den Ausgangswerten an. Hierdurch entstanden am Übergang kleine interlaminäre Schrumpfrisse (Abbildung 11). Diese konnten zwar zum einen zu einer Delamination führen, erleichterten gleichzeitig aber auch die Diffusion in die inneren Bereiche der Scaffolds. In Verbindungen boten die Kavitäten und Schrumpfungartefakte auch in der Tiefe der *Layer*-Schichtung Bedingungen, in denen sich vorrangig Zellansammlungen auf den Scaffolds finden (Abbildung 21). Ein größeres Oberflächen-Volumen-Verhältnis entstand unter anderem durch die *Layer*-Schichtung. Die Oberfläche war also einer - jedoch nicht der einzige - Einflussfaktor, durch den eine Besiedlung mit einer höheren Zellzahl erreicht werden konnte.¹¹²

Mikro- und Makrostruktur zu vereinen stellte eine Herausforderung dar. So wurde die Zellanhaftung und Oberfläche zwar durch die eben beschriebenen Mechanismen verbessert, gleichzeitig kam es aber auch zu einer Reduktion des Porenvolumens und damit zu einer behinderten Hämatomausbreitung und Nährstoffversorgung. Es galt also die Waage zwischen optimalen initialen Besiedelungsbedingungen, mechanischer Stabilität und der notwendigen Aufrechterhaltung der Nährstoffversorgung zu finden.

Die Designstudien wurden bisher nur *in vitro* getestet. Um den Verlauf durch sämtliche Phasen der Knochenheilung zu untersuchen, müssen neben weiteren Versuchen *in vitro* mit Simulation sämtlicher Knochenheilungsphasen, letztendlich auch Versuche *in vivo* stattfinden. Im Folgeprojekt soll zunächst das Ausgangsmaterial verändert und ein Bioglas-Polylaktat-Komposit entwickelt werden. Dieses dient dann als Ausgangssubstanz für die Realisierung der in dieser Arbeit entwickelten Designstudie des Tempels, an dem anschließend umfassende Versuche *in vivo* durchgeführt werden sollen.

4.1.3 Designstudie Raster

Das Raster stellte eine der frühen Ausgangsformen für weitere Entwicklungen dar und wurde aufgrund seiner Einfachheit in die Testreihe übernommen. Ähnliche Rasterentwürfe wurden bereits vorgestellt, so zum Beispiel das von Holzapfel et al. (2013), ein bereits *in vivo* getestetes Design auf PCL-Basis.⁶⁴ Die interkonnektierenden Poren befanden sich bei diesem vielversprechenden Ansatz jedoch nur in longitudinaler Richtung. Um eine derartige Grundstruktur mit einer hohen Interkonnektivität weiter zu öffnen und zusätzlich auch mit Poren von radial zu versehen, bedurfte es einiger Designänderungen. Dennoch können das Eindringen des Frakturhämatoms¹¹, die Neovaskularisation⁸³⁻⁸⁶ sowie die Nährstoffversorgung¹¹ in den inneren Bereichen des Scaffolds durch derartige Strukturänderungen weiter verbessert werden:

Um den 6 mm breiten Zentralkanal liegen die 3 mm breiten weiteren axialen Kanälen in variabler Anzahl. Die Poren führen mit lediglich 1 mm Durchmessern von zentral in die äußeren Bereiche. Es wurde ein Durchmesser von 1 mm gewählt, um eine größere Anzahl an Poren unterzubringen, ohne das Modell zu sehr in

seiner Stabilität zu schwächen. Die Problematik liegt hierbei vor allem in den inneren Bereichen. Da die Poren sich nicht verjüngen sollen, müssen sich auch zentral zwischen den Poren noch ausreichend große Freiflächen befinden. Dies führt dann, unter Beibehalten des Zentralkanaldurchmessers, zu einer maximal möglichen Anzahl von 17 Poren pro 360° je 1 mm Rasterhöhe. Im Vergleich zum Tempel verringert sich die Interkonnektivität und die Diffusionsstrecken vergrößern sich etwas.

Das Raster weist von allen Designstudien das geringste Oberflächen-Volumen-Verhältnis auf.

4.1.4 Designstudie Tempel

Der Tempel besteht aus den Untereinheiten der Einzelsäulen, zwei Verbindungsringen und dem in der Mitte befindlichen Reservoir. Mit dieser offenen Grundstruktur werden eine spätere Hämatopenetration sowie Nährstoffversorgung erleichtert: Durch Poren von 1 mm und 1,5 mm Durchmesser konnte eine größere Anzahl dieser untergebracht werden. Die Freiflächen zur Zellbesiedelung befinden sich in direkter Nachbarschaft zu den interkonnektierenden Porenabschnitten, wodurch geringe Diffusionsstrecken zu den Zellen gewährleistet werden. Die Zwischensäulenabstände variieren je nach gewünschtem Durchmesser durch die sich ändernde Säulenanzahl. Sie sind jedoch möglichst weit gehalten. Dies trägt zur offenen Grundstruktur mit all ihren Vorteilen bei.^{11,83-86}

Um dennoch eine mechanische Integrität der Einzelsäulen zu gewährleisten bilden die Ringstrukturen an den Enden und in geringem Maß auch das Reservoirsystem in der Mitte ein stabiles zusammenhängendes Gefüge. Dennoch ist der Tempel als mechanisch schwächster Entwurf noch weniger dazu in der Lage, die Kräfte, die z.B. auf das Femur wirken können, aufzunehmen (siehe Abschnitt 3.6).¹¹³ Da die einzelnen Säulen nur begrenzt Kräfte aushalten können, kann die Länge dieser nicht unbegrenzt gesteigert werden. Querkräften kann insbesondere durch den Druckprozess der Layerschichtung nur schlecht widerstanden werden. Ab einer gewissen Länge ist statt einer Säulenverlängerung auch eine Verlängerung durch Ineinanderstecken zweier einzelner Scaffolds über das Adaptersystem möglich.

Es sollte Erwähnung finden, dass die Hauptlast nicht von den Scaffolds getragen werden muss, sondern zusätzliche Plattenosteosynthesen als Kraftüberträger nötig sind.

Die Reservoirereinheit kann unterschiedliche Funktionen erfüllen. Neben der ursprünglichen Idee der Zellbeladungshilfe kann es auch als Medikamenten- oder Antibiotika-Freisetzungssystem genutzt werden. Denkbar wären hier zum Beispiel Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel VEGF, deren Freisetzungsgeschwindigkeit anhand der Trägersubstanz (z.B. PVA)¹¹⁴⁻¹¹⁶ und der Öffnungsfläche des Reservoirs zur Umgebung gesteuert werden können. Da zunächst die grundlegenden Eigenschaften *in vitro* evaluiert werden sollten, wurde das Reservoirsystem des Tempels noch nicht weiter getestet. Solche Additionen biochemischer Eigenschaften zu funktionellen Scaffolds können deren Wirksamkeit im Hinblick auf Osteoinduktivität und Angiogenese verbessern.^{57,58,117,118} Auch der hexagonale Anschluss an einem Ende des Reservoirs war ursprünglich für die Zellversuche gedacht. Er könnte jedoch ebenfalls zur Verankerung oder zur Entwicklung und zum Anschließen weiterer Adapter dienen. Während das Oberflächen-Volumen-Verhältnis des Tempels nur geringfügig niedriger ist als das der Zwiebel, so ist die absolute Masse - und damit das einzubringende Fremdmaterial¹¹⁹ - deutlich geringer. Setzt man hingegen die Oberfläche als positiven Faktor in ein Verhältnis zur Masse des eingebrachten Fremdmaterials¹¹⁹, besitzt der Tempel mit 5839 mm²/g einen niedrigeren Wert als die Zwiebel (7047,552 mm²/g). Dieser geometrische Vergleich berücksichtigt jedoch nicht weitere ausschlaggebende Faktoren wie Anzahl der Poren und Offenheit der inneren Bereiche. Erste Versuche zur Durchtränkung der Modelle mit einer Trägerlösung, die der Viskosität von Blut entspricht, die Gegenstand aktueller weiterer Forschung sind, zeigten beim Tempel die homogenste Verteilung. Betrachtet man auch diese Punkte stellt der Tempel ebenfalls einen vielversprechenden Entwurf dar.

4.1.5 Designstudie Zwiebel

Die Zwiebel besteht, ähnlich dem Raster, aus einer variablen Anzahl an radial angeordneten axialen Kanälen von 3 mm Durchmesser als Untereinheiten. Das

Design besitzt aber im Gegensatz zu den anderen beiden Entwürfen keinen durchgehenden Zentralkanal. Dieser wurde zum Zwecke der Oberflächen- und Querstabilitätsvergrößerung durch weitere Ringe mit durchstoßenden Poren ersetzt. Hierdurch vergrößerten sich zwar die Oberflächen, aber auch die Diffusionsabstände im Vergleich zum Tempel.

Durch die Ringstruktur wurden größere Hohlräume geschaffen, die durch die Poren miteinander kommunizieren können. Da die Ringstruktur auch in den inneren Bereichen für einen Integrität des Entwurfs sorgt, konnte die Porenanzahl pro 1 mm Höhe auf 18 Poren pro 360 ° angehoben werden. Dies führte in den innersten Bereichen zu einer Art Langloch. Um auch bei der Zwiebel vom Adaptersystem profitieren zu können, wurde der Zentralkanal in den äußeren 5 mm auf beiden Seiten angedeutet. Dies erschwert den Druckprozess geringfügig, da währenddessen kleinere sog. *Bridging*-Distanzen zu überwinden sind. Der Druckkopf überbrückt beim *Bridging* kurze Distanzen ohne darunterliegende unterstützende Strukturen und drückt daher in der Luft. Dies wird neben einer nur geringen zu überbrückenden Distanz auch durch eine ausreichende Druckgeschwindigkeit sowie Bauteilkühlung ermöglicht. Der Einsatz einer sogenannten *Support*-Struktur, also dem Hinzufügen einer Art Brückenpfeiler, auf den das extrudierte Filament abgelegt werden kann, war nicht notwendig. Dadurch, dass die Adapteröffnung lediglich an den Enden des Scaffolds angebracht ist, können nur jene Adapter verwendet werden, die kein vollständiges Einschieben in das Scaffold erfordern.

Bei den Modellen Zwiebel und Raster muss deren dichtere Struktur zeigen, ob das Frakturhämatom in der Lage ist, von allen Seiten bis in die Mitte zu gelangen und ob auch unter Koagulation die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung aufrechterhalten werden kann. Das Oberfläche-Masse-Verhältnis liegt mit 7047,552 mm²/g über dem des Tempels.

4.1.6 Baukastensystem und Funktionsadapter

Die Funktionen der Scaffolds zu erweitern und den Anforderungen anzupassen stellt einen weiteren Ansatz dar, der mit den Designstudien verfolgt wurde. Ein an beiden Enden der Scaffolds befindlicher standardisierter Abschnitt (Abbildung

18) dient als Aufnahme für Adapter. Verankert werden diese als Übergangspassung. So kann, bei gleichzeitig einfacher Anwendung, auf aufwendige Verankerungsmechanismen wie Bajonettverschlüsse verzichtet werden.

Ein Vorteil der Standardisierung ist außerdem die Möglichkeit kosteneffektiv auch andere Fertigungstechniken und Materialien für die Herstellung der Adapter verwenden zu können. So ist es denkbar, für den Bohrkopf das PLA als feste Gerüststruktur⁸² zu nutzen, gleichzeitig z.B. durch einen hohen Bioglasanteil aber eine schnelle Resorption zu gewährleisten, um die Enden des Scaffolds schnell wieder freizugeben.⁵⁴

Die Kombinationsadapter wurden neben der Übergangspassung mit einem Verankerungszinken ausgestattet. Dieser verstärkt die Verbindung beim Ineinanderschieben der Scaffolds. Durch Verbinden der Scaffolds können auch größere Defekte überbrückt werden, bei denen sonst ein alleiniges Verlängern der funktionellen Untereinheiten eine mechanisch stabile Einzellänge überschreiten würde.

Medikamente, z.B. Antibiotika, können mithilfe des Reservoirs bedingt durch dessen Geometrie, durch unterschiedliche Wandungen verschiedener Kammern und den Einsatz wasserlöslicher Materialien wie PVA in ihrer Freigabegeschwindigkeit und ihren Wirkspiegeln moduliert werden (siehe hierzu auch Abschnitt 4.1.4).

Die Kombination mehrerer Adapter in Längsrichtung kann dann von Interesse sein, wenn einzelne Untereinheiten bei großen Defekten zu lang werden und damit in ihrer Stabilität geschwächt werden. So würden z.B. die weiteren Ringstrukturen des Tempels dessen Einzelsäulen stabilisieren.

Die Verwendung einer ferromagnetischen PLA-Ausgangssubstanz ermöglicht einige weitere Funktionen. So könnte durch eine Spule mittels Induktion durch Elektromagnetismus z.B. eine Oszillation der Designstudien in niedriger Frequenz erreicht werden.

Sämtliche dieser Adapter stellen ein Produkt früher Entwicklungsphasen dar. Sie wurden realisiert und gedruckt, jedoch nicht *in vitro* getestet.

4.1.7 Ausgangssubstanz Polylaktat

Polylaktide sind synthetische Polymere aus aneinandergereihten Milchsäuremolekülen. Aufgrund der Materialeigenschaften und den daraus resultierenden Vorteilen fiel die Entscheidung auf die Verwendung von PLA als Ausgangssubstanz zum Testen der Designs. PLA zeigt eine hohe Biokompatibilität und besitzt das FDA-Zertifikat der *US Food and Drug Administration*.¹²⁰ Es erfreut sich breiter Anwendung als Nahtmaterial, Klappenersatz oder Miniplatte.¹²¹ Häufig sind in den für den FFF-3D-Druck produzierten PLA-Filamenten jedoch Beimengungen wie Farbstoffe enthalten. Aus diesem Grund wurde für die *in vitro* Versuche das Filament „natur“ der Firma 3dk.Berlin verwendet, für das eine Konformitätserklärung verfügbar ist (siehe Anhang 1). Weiterhin gibt es für dieses Filament Datenblätter mit den mechanischen und chemischen Eigenschaften (siehe Anhang 2). Aufgrund dieser Datenblätter des Herstellers konnte von gleichbleibenden Qualitätsmerkmalen des verwendeten Filaments ausgegangen werden. So wurden Störfaktoren durch fehlende Druckreproduzierbarkeit vermieden. Dennoch musste beachtet werden, dass der Rohstoff PLA mit der Zeit seine physikalischen Eigenschaften durch Alterung verändert.¹²² Der Einflussfaktor Alter kann sich nicht nur während des Druckprozesses zeigen, sondern auch bei späteren Versuchen einen störenden Einfluss haben. Aus diesem Grund wurde versucht, die Tests in einem engen Zeitrahmen und möglichst zeitgleich durchzuführen, um die Störeinflüsse durch Alterung zu minimieren.¹²³

PLA ist ein ausgezeichnet druckbares Filament und weist hierbei nur geringen Verzug auf. Während des Druckprozesses entstehen temperaturabhängig Dämpfe. Diese sind im Falle von PLA weniger giftig als es zum Beispiel bei ABS der Fall ist, wo die Kanzerogene Styrol und Formaldehyd emittiert werden. Pelley (2017) zufolge setzt PLA während des Druckprozesses Methacrylsäurethylester frei.¹²⁴ Dieser Stoff ist ein Bestandteil von Knochenzement und kann z.B. milde Hautirritationen auslösen.¹²⁵

PLA weist einige weitere nachteilige Eigenschaften auf. Zum einen besitzt es keine intrinsischen osteoinduktiven Eigenschaften, sondern ist lediglich geringgradig osteokonduktiv.³⁵

Der Degradierungsmechanismus im Körper von PLA ist noch nicht vollends geklärt. Angenommen wird ein Hydrolyse-Prozess mit zellulärer Beteiligung.^{79,121,126} Weiterhin bestehen auch interindividuelle Unterschiede und so kann die Abbaupzeit zwischen vielen Monaten und einigen Jahren liegen.^{82,121,126} Dies impliziert einen langen Verbleib im Frakturspalt und verhindert die Osteogenese in diesen Bereichen. Es steigt nicht nur das eingangs erwähnte Pseudarthrose-Risikos, sondern auch das Refraktur-Risiko in Regionen ungenügender Durchbauung.^{46,47}

Zum anderen setzt PLA während des Degradationsprozesses saure Bestandteile in die Umgebung frei. Der pH-Wert sinkt und kann zu einer Entzündungsreaktion bis hin zum Zellsterben führen. Außerdem kann hieraus eine beschleunigte Degradierungsrate resultieren.¹¹⁹

Diesem Nachteil kann jedoch entgegengewirkt werden: Durch die Mischung von PLA als Composit-Material z.B. mit Bioglas, dessen Degradierungszeit gering ist, kann eine optimale Resorptionskinetik entworfen werden.⁵⁶ Diese kann maschinell berechnet und an Lokalisation, Belastung und Alter des Patienten angepasst werden. Zusätzlich können die basischen Abbauprodukte des Bioglas als Puffer gegenüber den sauren Bestandteilen des Polylaktats wirken.¹¹⁹ Genauere Erkenntnisse sollen in weiteren Forschungsprojekten gewonnen werden.

4.1.8 Technologie 3D-Druck

Die additiven Fertigungsverfahren und insbesondere das *Rapid Prototyping* bieten einen sich mit rasender Geschwindigkeit entwickelnden Innovationszweig und ermöglichen die kostengünstige Entwicklung und Herstellung von Kleinserien und an den Patienten angepassten Scaffolds.⁶⁴ Diese neuen Verfahren haben auch die Entwicklung einer ganzen Palette von 3D-Software vorangetrieben, die den Markt erobern. So stehen allerhand 3D-Bearbeitungssoftware wie *Fusion 360* zur Verfügung.

Doch das FFF-Verfahren weist auch einige Nachteile auf. So ist die Materialauswahl auf (meist thermoplastische) Polymere und Komposite beschränkt. Es lässt sich also nicht jedes beliebige Material drucken. Da es jedoch bereits einige druckbare und gleichzeitig biokompatible Polymere gibt, stellt, wie unter 4.1.7

beschrieben, vor allem die Sterilisation ein limitierender Faktor dar. Die Nutzung anderer Verfahren wie dem *Selective Laser Melting* (SLM) oder des SLA ermöglichen die Verwendung anderer Materialien, wie Metallen oder medizinischer Resins. So muss für jede spezifische Anwendung das passende Verfahren gefunden werden. Für den Prozess einer kostengünstigen und biokompatiblen Scaffold-Designentwicklung, die gleichzeitig eine mikroskopisch feine Oberflächenstruktur erzeugt, bietet das FFF-3D-Druck-Verfahren eine solide Basis. Durch die wiederum hohen Temperaturen während des Verarbeitens des PLA und anderen Thermoplasten ist es zumindest mit einem Druckkopf nicht möglich, sofort Zellen mit in das Scaffold zu drucken. Für die Anwendung eines solchen Bioprinters wäre zum Beispiel ein weiterer Druckkopf notwendig.

Die *Layer*-Schichtverfahren wie das FFF bieten außerdem Limitationen bezüglich der Auflösung. Auch wenn immer präzisere Maschinen den Markt erobern (Raise3D Pro2 Series, minimale *Layer-Höhe* bei einfachen Geometrien von 10 μm)¹²⁷, so sind andere Verfahren, wie z.B. die SLA in der Lage, wesentlich feinere Auflösungen zu erreichen. Ob derartige Auflösungen für die Anwendung als Scaffold aktuell notwendig sind, soll hier jedoch nicht erörtert werden.

4.2 Desinfektion

Die klinische Anwendung eines Medizinproduktes erfordert einige Rahmenbedingungen. Hierzu gehört unter anderem eine suffiziente Sterilisation. Die unterschiedlichen Verfahren lassen sich in die Untergruppen thermische, physikalische und chemische Sterilisation unterteilen. Die nachträgliche thermische Sterilisation, zum Beispiel im Autoklav, zeigt sich bei thermoplastischen Polymeren wegen der Verformung der Scaffolds erschwer. Eine mögliche - jedoch kostenintensive - Alternative ist das physikalische Verfahren der Bestrahlung mit UV- oder Gammastrahlen. Grémare et al (2017) konnten zeigen, dass die Oberfläche 3D-gedruckter Scaffolds nach Sterilisation mit Gammastrahlung keinen negativen Effekt auf humane mesenchymale Stromazellen zeigt.¹²⁸ Die Strahlenexposition verändert jedoch dosisabhängig die Materialeigenschaften des PLA: Bei steigenden Dosen kam es von Veränderungen der mechanischen Stabilität und des Elastizitätsmodul bis hin zur Degradation bei Dosen über 60 kGy.¹²⁹ Aufgrund

dessen und der einfacheren Durchführung fiel die Entscheidung für die *in vitro* Versuche lediglich auf die Desinfektion mit 70 % vol Ethanol. Damit wurden die Regularien für Medizinprodukte zwar nicht erfüllt, eine für die Laborversuche ausreichende Keimelimination jedoch erreicht (siehe Abschnitt 3.2).

Im späteren klinischen Einsatz lässt sich eine Sterilität nicht nur durch UV- oder Gammastrahlung gewährleisten. Ein alternativer Ansatz ist die Verwendung des FFF-Druckers selbst zur thermischen Sterilisation der zu druckenden Scaffolds. Der Druckraum eines Druckers kann eine sterile abgeschlossene Umgebung darstellen. Zusätzlich werden während des Extrusionsprozesses mit Temperaturen von 200 °C weitaus höhere Temperaturen erreicht als z.B. während des Autoklavierens. Lediglich die Expositionsdauer ist stark von der Druckgeschwindigkeit abhängig. Sterilität lässt sich nur indirekt durch die Abwesenheit einer Kontamination nachweisen. Versuche von Russell Y. Neches et al. (2016) zeigen aber vielversprechende Ergebnisse, sodass die Autoren von einer „Intrinsischen Sterilität“ des FFF-3D-Druckers sprechen.¹³⁰

4.3 Zelladhäsion und Zellaktivität

Als Zellart wurden Saos-2-Zellen gewählt, da diese für die initialen Versuche einfach und kostengünstig zu handhaben waren und dennoch ähnliche Kolonialisierungsbedingungen wie MSC boten. Sie werden häufig für ähnlich gelagerte Fragestellungen wie in der vorliegenden Dissertation verwendet.^{131,132} Sie sind osteogen differenzierbar und in der Lage, Calcium-Ablagerungen zu bilden. Es zeigte sich bei direkter Besiedelung der PLA-Oberfläche eine gering ausgeprägte Zelladhäsion. Andere Studien zeigten auch für andere Zellarten wie MSC nur geringe initiale Adhäsionszahlen auf einer reinen PLA-Oberfläche.¹³³ Dies kann auf die hydrophobe Oberfläche des Polylaktats zurückzuführen sein, die von Zellen schlechter angenommen wird. Durch Beschichtung der Oberfläche ließ sich die Anzahl der adhärenen Zellen jedoch steigern. Die Entscheidung fiel auf eine Beschichtung der Oberfläche mit CellTak. Dies konnte die Besiedelungseffektivität steigern (siehe Abschnitt 3.3). Bei CellTak handelt es sich um eine Gruppe extrahierte Proteine, insbesondere Mefp-1, aus der Muschelart *Mytilus edulis* (Gemeine Miesmuschel).¹³⁴ Auch unter Beschichtung zeigten sich bevorzugte

Besiedelungsbereiche der Saos-2-Zellen in Vertiefungen, wie *Layer*-Zwischenräumen, *Stringing*-Fäden und interlaminären Schrumpfungsrissen. Dies bestätigt auch die Rasterelektronenmikroskopie. Der Zellrasen breitete sich vor allem entlang der *Layer*-Zwischenräume aus. Eine Matrix aus Zellfortsätzen überspannte auch die 100 µm hohen *Layer*, wodurch sich ein sehr dichtes Zellbesiedelungsbild wie in Abbildung 21 ergab.

Die Scaffolds wurden in aufrechter Position besiedelt. Betrachtet man Tag 1 der Zellaktivitätslevel im MTT-Test (Abschnitt 3.4) und geht davon aus, dass eine größere Anzahl anhaftender Zellen mit einer höheren Aktivität einhergeht, lassen sich die höheren Werte beim Raster, bzw. die bessere Post-Besiedelungsaktivität erklären. Auch wenn hier das niedrigere Volumen-Oberfläche-Verhältnis vorlag, so konnte die höhere Anzahl an horizontalen Flächen und dichteren Strukturen im Innern die Zelladhäsion initial und damit im Verlauf begünstigt haben. Das größere Volumen des Rasters beeinflusste auch die Mikrostruktur. Im Innern kam es durch die vielen Reisebewegungen des Extruders zu vermehrtem *Stringing*.

Die Besiedelung fand unter Viskositätsbedingungen des Standard-Mediums statt. So zeigte sich eine einfachere Penetration der Zell-Mediums-Suspension in die inneren Bereiche der Scaffolds. Beim Aufblick auf Poren ließ sich in der Fluoreszenzmikroskopie auch in den inneren Bereichen des Scaffolds eine Zellbesiedelung nachweisen (Abbildung 20). Ob die Besiedelung bei dem eindringenden Frakturhämatom mit steigender Viskosität durch *Clotting*-Vorgänge auf der Fremdoberfläche¹⁰⁸ jedoch auch bis ins Innere ermöglicht wird, muss noch *in vitro* gezeigt werden. Dieser *Clot* hätte, wie eingangs erwähnt, auch bezüglich der Sauerstoff- sowie Nährstoffversorgung einen negativen Einfluss auf die Zellen in den zentralen Bereichen. Die offene Struktur des Tempels sollte hingegen unter den entworfenen Modellen bezüglich der Nährstoffdiffusion den geringsten Widerstand bieten.

Um während des Zellaktivitätstest nur die Aktivität der auf den Scaffolds befindlichen Zellen zu messen, wurden die Scaffolds am Tag der Messung in ein neues Well umgesetzt. Dabei konnte nicht ausgeschlossen werden, dass nur gering adhärente Zellen vom Scaffold abgefallen sind.

Ein weiteres Problem während des MTT-Tests zeigte sich beim Herauslösen des zu Formazan umgewandelten MTT. Für die Messung mittels Photometer wurde dieses Formazan mit Solubilisierungs-Flüssigkeit herausgelöst. Das Herauslösen wurde vor allem in den inneren Bereichen der dichteren Modelle Zwiebel und Raster deutlich erschwert, da die Lösung einen zähen und viskosen Verbund mit der Scaffold-Oberfläche bildete. Allein schon aufgrund der noch geringfügig dunkelviolett eingefärbten PLA-Oberfläche der Scaffolds ist davon auszugehen, dass auch nach Spülen mit Solubilisierungs-Flüssigkeit noch Reste des photometrisch zu bestimmenden Formazan im Innern der Scaffolds verblieben. Denkbar wäre hier für weitere Versuche ein Herauslösen des Formazan durch Druckspülen mit Solubilisierungs-Lösung an einem Ende der Scaffolds.

Bei der Degradation von PLA zu Milchsäure-Oligomeren kann es zu einem Abfall des pH-Wertes in der unmittelbaren Umgebung des Scaffolds kommen.¹¹⁹ Der pH-Wert wurde während der Versuche nicht genau bestimmt. Bei einer maximalen Versuchsdauer von 21 Tagen und der Verwendung von Saos-2-Zellen war nicht mit einer massiven Degradation der PLA-Scaffolds zu rechnen. Das Kulturmedium enthielt einen Farbindikator, der im Falle eines sinkenden pH-Werts von rosa zu gelb umschlägt. Dieser wurde jedoch auch durch physiologische Stoffwechselprozesse der Zellen in den sauren Bereich verschoben. Es ist davon auszugehen, dass durch die Pufferwirkung des Kulturmediums und die häufigen Wechsel desselben die Zellen nicht zu Schaden kamen.

4.4 Osteogene Differenzierung

Reines PLA besitzt keine intrinsischen osteoinduktiven Eigenschaften. Osteoinduktive Eigenschaften des PLA-Scaffolds selbst können durch Erstellung eines Komposits, z.B. mit Bioglas, erreicht werden. Die Herstellung und das Drucken eines solches Komposits waren in dieser Arbeit nicht vorgesehen, sollen jedoch Gegenstand zukünftiger Versuche sein. Um dennoch eine Osteoinduktion und damit Osteogenese herbeizuführen, wurde das Standard-Medium nach dem Prozedere in Absatz 2.3.3 mit weiteren Substanzen supplementiert. Die osteogene Differenzierung mithilfe dieser chemischen Substanzen wurde von Jaiswal et al. (1997) dargestellt.¹³⁵ Eine solche Differenzierung resultiert, wie Peters et al.

(2009) zeigen konnten, in einer histologisch, wie auch biomechanisch signifikant besseren Knochenheilung.¹³⁶

Die Alizarin-Färbung weist Calcium-Ablagerungen durch rotes Anfärben nach. Diese Ablagerungen werden durch die Saos-2-Zellen auf den Scaffolds produziert und waren auf sämtlichen Scaffolds in osteogenem Medium nachweisbar. Es war also davon auszugehen, dass die Zellen eine osteogene Differenzierung durchliefen und von dieser nicht geschädigt wurden. Dass auch auf den Scaffolds in Standard-Medium geringfügige Ablagerungen sichtbar waren, kann analog zu den Zellaktivitätstests unter 3.5.1, am Waschschrift liegen. Um überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurden die Scaffolds nach dem Färben mit Aqua dest. gewaschen. Die Calciumablagerungen hafteten nicht rigid an der PLA-Oberfläche, weshalb der Waschschrift auch die Ablagerungen und nicht nur die ungebundene Farbe entfernte. Um dennoch ein vergleichbares Ergebnis zu erhalten, wurden die Scaffolds in den beiden Medien in gleicher Häufigkeit und Intensität gewaschen. So ergab sich das in Abschnitt 3.5.2 gezeigte Bild. Die makroskopisch sichtbare vermehrte Anfärbung im Bereich der Poren und Kanäle bestätigte erneut die bereits unter 4.3 beobachtete höhere Besiedlungsdichte der Zellen in diesen Bereichen. Die mikroskopische Auswertung gestaltete sich insbesondere bei den Modellen Zwiebel und Raster kompliziert. Zum einen ließen sich die inneren Bereiche durch das Waschen nicht vollständig von überschüssiger Farbe entfernen, ohne dabei auch auf der Außenseite gebundene Zellen abzuspülen. Zum anderen wirkten die durchsichtigen rot eingefärbten Modelle wie eine Art Lichtdiffusor und färbten das vom Mikroskop durchscheinende Licht im gesamten Well rot.

Die Genexpressionsversuche zeigten bei Tempel und Zwiebel eine Erhöhung der Geneexpression von *collagen-1 alpha* und bei der Zwiebel zusätzlich für die Alkalische Phosphatase. Zusätzlich war bei der Zwiebel auch das für Osteocalcin kodierende Gen hochreguliert worden. Sämtliche dieser Gene werden von Osteoblasten exprimiert. Die Alkalische Phosphatase kommt in ihren Isoformen in vielen Organen vor.^{137,138} Im Knochengewebe wird sie vor allem bei Umbauprozessen oder während der Frakturheilung exprimiert.¹³⁸ *collagen-1 alpha* stellt ein fibrilläres Strukturprotein dar und ist als häufigster Kollagentyp in verschiedenen Geweben wie Haut, Sehnen oder Knochen nachweisbar.^{139,140} Beide für diese

Proteine kodierenden Gene zeigten im Zeitverlauf ein frühes Expressionsmaximum. Das Gen für Osteocalcin wurde erst später hochreguliert. Osteocalcin ist ein Peptidhormon und Bestandteil der extrazellulären nichtkollagenen Matrix. Es zeigten sich unterschiedliche Dynamiken der exprimierten Gene, die bereits in anderen Arbeiten gezeigt werden konnten.^{141,142} Im Versuch zur Genexpression galt es zunächst nachzuweisen, dass es überhaupt zu einer Regulation der relevanten Gene der Osteogenese kam. Aus diesem Grund wurde lediglich eine Querschnittsstudie an Tag 21 durchgeführt. So konnten jedoch weder eine Dynamik noch die absoluten Maxima nachgewiesen werden. Dass im Falle des Rasters keine Genexpression nachweisbar war, kann am Verfehlen dieses Zeitpunktes liegen. Wie auch schon bei den Zellaktivitätsversuchen folgt das Raster einer anderen Dynamik. Ob dies an der anderen Geometrie und dem niedrigeren Oberflächen-Volumen-Verhältnis lag, ist zu diesem Zeitpunkt Spekulation und bedarf weiterer Versuche. Es ist auch möglich, dass sich Fehler durch andere Störfaktoren auf das Ergebnis ausgewirkt haben. So ist ein noch nicht ausgereiftes Handling mit den Scaffolds während der Versuche denkbar.

4.5 Mechanische Evaluation

Selbst unter normaler Belastung wie zum Beispiel einfachem Gehen muss das Femur des Menschen hohen Kräften widerstehen. Diese fallen in den verschiedenen Richtungen unterschiedlich stark aus. Maximale Werte werden in axialer Richtung erreicht. Bergmann et al. (2016) konnte bei auf 100 kg gemittelten Probanden Kräfte von bis zu 2880 N beim Gehen nachweisen. Belastungen wie Treppensteigen oder gar Joggen erhöhen diese Kräfte nochmal auf durchschnittlich 4839 N.¹¹³

Sämtliche Designstudien konnten aufgrund des Ausgangsmaterials und der bewusst gewählten offenen Geometrie diese Kräfte nicht aufnehmen. So kann der Tempel nur 87 N aufnehmen, Raster und Zwiebel widerstanden hingegen 513 N, bzw. 463 N. Die Zwiebel konnte, am ehesten bedingt durch die Ringstruktur, Querkräfte besser aufnehmen und wich beim Zusammenpressen am wenigsten zur Seite aus (Abbildung 29). Dennoch muss beachtet werden, dass keines der Modelle in der Lage war, den Belastungen unter physiologischen Bedingungen

standzuhalten. Einige andere Knochenersatzmaterialien widerstehen solchen Kräften, zeigen gleichzeitig jedoch eine wesentlich niedrigere Porosität.^{49,143}

Bei einem Verzicht auf eine hohe Porosität zu Gunsten der mechanischen Stabilität stellt die geringere Hämatompenetration, Nährstoffversorgung und Zellüberleben einen limitierenden Faktor dar.^{89,106,107} Die vorgestellten Designentwürfe dieser Arbeit müssen nicht zur vollständigen Lastaufnahme in der Lage sein, denn sie sollen keine Osteosynthese ersetzen. Stattdessen sollen sie als Basis für optimiertes Knochenwachstum dienen. Eine Belastungsstabilität kann später durch den Einsatz einer überbrückenden und damit kraftübertragenden Osteosynthese, z.B. in Form einer dem Knochen anliegenden Plattenosteosynthese, erreicht werden. Die Designstudien stellen vielmehr Platzhalter dar, welche optimale Bedingungen für die Osteogenese bieten können. Dennoch erlaubten die in dieser Arbeit vorgestellten Designs, im Gegensatz zu den in Granulatform erhältlichen Knochenersatzmaterialien, eine gewisse mechanisch-stabile Integrität.⁶⁵ Hierdurch ist eine Verankerung durch Einpressen im Knochendefekt möglich, was auch die Handhabung erleichtert. Außerdem kann ein Zusammensintern oder eine sofortige Umverteilung des eingebrachten Materials im Gewebe verhindert werden.

Eine mechanische Schwachstelle der FFF-3D-gedruckten Scaffolds war die durch den Druckprozess entstehende *Layer*-Schichtung. Senkrecht zur Schichtung entstehende Kräfte können wesentlich besser über das Design verteilt werden, wohingegen Kräfte in Längsrichtung der einzelnen Schichten schon früher zur Aufspaltung und damit Delamination dieser führen können.

Mit steigender Temperatur verlieren thermoplastische Polymere wie PLA an mechanischer Stabilität.¹⁴⁴ Die Wärmeformbeständigkeitstemperatur (HDT für *heat distortion temperature*) gibt an, ab welcher Temperatur es im Dreipunktbiegeversuch zu einer Dehnung von 0,2 % kommt (vgl. DIN EN ISO 75). Für das Ausgangsmaterial PLA liegt die HDT laut Datenblatt bei 55 °C (siehe Anhang 2). Selbst hohe Körpertemperaturen des Menschen liegen noch unterhalb dieses Temperaturbereichs. Die niedrige HDT von PLA bewirkt jedoch, dass eine thermische Sterilisation zu Form- und Strukturveränderungen der Scaffolds führen würde und damit nicht möglich ist.

4.6 Ausblick

Die Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung neuer Knochenersatzdesigns auf Basis von Polylaktat, ohne dabei rein biomimetisch vorzugehen, sondern auch Aspekte wie die Frakturhämatomausbreitung in Betracht zu ziehen. Dennoch muss es zur Erstellung eines optimalen Knochenersatzstoffs nicht nur Aufgabe sein, ein neues Design zu entwickeln, sondern dieses auch mit weiteren, der Knochenheilung zuträglichen Eigenschaften auszustatten. Hierzu zählen die Verbesserung bzw. das Hinzufügen einer Osteokon-, bzw. Osteoinduktivität. Dies soll im nächsten Schritt durch eine Weiterentwicklung der Ausgangssubstanz geschehen. So ist es das Ziel, ein Filament auf Bioglas-Polylaktat-Basis zu entwickeln, das mittels additiver Fertigung extrudiert und verarbeitet werden kann. Hierdurch können dem Scaffold nicht nur die oben genannten Eigenschaften zugefügt werden, sondern auch jene des Bioglases wie optimale Resorptionskinetik, bessere Zelladhäsion und antimikrobielle Eigenschaften genutzt werden.

Auch sollen die hier vorgestellten Knochenersatzdesigns erneut weiterentwickelt werden. Zu den zu verfolgenden Zielen zählen unter anderem das Hinzufügen einer internen Fachwerkstruktur, Provozieren von *Stringing* und die Adapterweiterentwicklung. Anschließend sollen umfassendere *in vitro* Versuche durchgeführt werden. Zeigen diese positive Ergebnisse, kann über *in vivo* Versuche der funktionellen Untereinheiten wie der Einzelsäule im Kleintiermodell zur Verifizierung nachgedacht werden.

Die Weiterentwicklung der hierbei erstellten Designs geschieht in Zusammenarbeit mit der TU Darmstadt (Institut für Drucktechnik Darmstadt; IDD) und der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz im Rahmen der Rhein-Main-Universität.

5 Zusammenfassung

Die Therapie langstreckiger Knochendefekte stellt auch weiterhin eine große Herausforderung dar. Dies beruht unter anderem darauf, dass der therapeutische Goldstandard - die Verwendung von autogener Knochensubstanz aus dem Beckenkamm - neben der begrenzten Verfügbarkeit vor allem Komplikationen im Bereich der Entnahmestelle mit sich bringen kann. Es wurde bisher aber noch kein durchschlagendes Ergebnis in der Entwicklung neuer Scaffolds zum Einsatz bei langstreckigen Knochendefekten erreicht. Dies kann eine Vielzahl an Ursachen haben, die sich von der verwendeten Ausgangssubstanz, bis hin zum verwendeten Design erstrecken können. Neben dem Ausgangsmaterial spielen vor allem die Formgebung und physikalische Eigenschaften, wie Porosität und Mikroarchitektur, eine wichtige Rolle.

Ein aktueller Ansatz zur Nutzung als alternatives Knochenersatzmaterial ist das Knochen-*Tissue-Engineering*. Hierbei werden körpereigene, knochen-regenerative Zellen mit einem dreidimensionalen Gerüststoff (Knochenersatzmaterial oder -scaffold) kombiniert und in den Knochendefekt implantiert. In dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Designentwicklung eines neuen Knochenersatz-Scaffolds gelegt. Nach Vorbild schon vorgestellter Knochenersatzdesigns und unter Berücksichtigung einer Grundstruktur, die auch Phasen der Knochenheilung wie die Frakturhämatomausbreitung und initiale Nährstoffversorgung einbeziehen sollte, wurden mehrere Designs (Raster, Tempel, Zwiebel) entwickelt. Mithilfe des additiv extrusionsbasierten Schmelzschichtverfahrens (*Fused Filament Fabrication*) wurden die in *Computer-Aided Design* entworfenen Scaffolds realisiert.

Dieser Ansatz beinhaltet, unter Verwendung des resorbierbaren und biokompatiblen Trägerpolymers Polylaktat, mehrstufige Designs, die kleine biologisch funktionelle Einheiten in eine tragende, kompressionsfeste Rahmenstruktur einbetten. Hierdurch entsteht einerseits die nötige mechanische Belastbarkeit und andererseits eine offene Architektur mit Poren, die Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen in die inneren Bereiche des Implantats ermöglicht. Es wurden verschiedene Designs entwickelt, gedruckt und mechanisch sowie *in vitro* in den Kernbereichen Zelladhäsion, Zellaktivität und osteogene Differenzierung nach Besiedelung mit Saos-2-Zellen charakterisiert.

Ein weiterer Entwicklungsschritt stellte das Einführen eines neuartigen, innerhalb der Designs kompatiblen Baukastensystems dar. Hierdurch wird nicht nur die Anpassbarkeit an den Knochendefekt verbessert, es sind auch weitere Funktionen ergänzbar und die unterschiedlichen Designs untereinander kombinierbar.

Die Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit dienen als Basis für einen völlig neuen Ansatz von Knochenersatzmaterialien mit positiven biologischen sowie biophysikalischen Eigenschaften.

6 Summary

Lack of effective and unlimited available therapy options to treat large and critical size bone defects remain a challenging problem in reconstructive surgery. This leads to the circumstance that autologous bone transplantation from iliac crest still is the present gold standard, although it bears some disadvantages: For example, there are limited availability and donor site morbidity like pain or infection. So, there is a need for a different treatment approach.

Bone-tissue-engineering as an alternative treatment option uses cells with bone-regenerative abilities within a three-dimensional structure. Combining this technique with the upcoming technology of additive manufacturing, more precise fused-filament-fabrication can be a key to a different treatment. There are several requirements that must be met for an ideal scaffold used as a bone substitute, starting with the base material for the frame of the scaffold, carrying on with design parameters like porosity, micro- and macro-architecture and ending with seeding and improving cell survival.

This doctoral thesis focusses on the development and improvement of different designs usable as bone substitutes. Following the idea of some published examples, more porous and interconnected approaches were developed with the goal not to hinder bone regeneration during different phases of bone healing, especially spread of fracture hematoma and nutrient supply. Results of the computer-aided design process were three different design studies called *Raster*, *Tempel* and *Zwiebel*, the German words for grid, temple and onion. They were realized with the additive extrusion-based fused filament fabrication 3D-printing technology under use of the biocompatible base material polylactic acid. The designs

integrate the microstructure provided by the printing process itself within functional subunits. These subunits are combined into a rigid, customizable and scalable frame structure. After printing these designs, they have been evaluated mechanically and biologically *in vitro* in terms of cell adhesion, cell activity and osteogenic differentiation.

Taking everything together this thesis resulted in a scaffold which combines mechanical resilience and an open structure with pores that allow diffusion of oxygen and nutrients into the inner parts of the scaffold. Another innovative result is the introduction of a modular system, usable with all designs. It allows better adaption of the scaffolds to the bone defect, combination of different scaffolds or addition of further functions like reservoir systems.

7 References

1. Towfigh H, Hierner R, Langer M, Friedel R. *Handchirurgie*. 1st ed. 2011. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011.
2. Biberthaler P, van Griensven M, eds. *Knochendefekte und Pseudarthrosen*. 1st ed. 2017. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2017.
3. Berggren A, Weiland AJ, Ostrup LT, Dorfman H. Microvascular free bone transfer with revascularization of the medullary and periosteal circulation or the periosteal circulation alone. A comparative experimental study. *J Bone Joint Surg Am*. 1982;64(1):73-87.
4. Schubert EC, van Griensven M. Blutversorgung des Knochens. In: Biberthaler P, van Griensven M, eds. *Knochendefekte und Pseudarthrosen*. Vol. 55. 1st ed. 2017. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2017:19-29.
5. Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004;36(1):1-8. doi:10.1016/S1357-2725(03)00241-3.
6. Doty SB. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif Tissue Int*. 1981;33(5):509-512. doi:10.1007/bf02409482.
7. Siegenthaler W, Amann-Vesti B, eds. *Klinische Pathophysiologie: 239 Tabellen*. 9., völlig neu bearb. Aufl. Stuttgart u.a.: Thieme; 2006.
8. Scharf H-P, Anagnostakos K, eds. *Orthopädie und Unfallchirurgie: Facharztwissen nach der neuen Weiterbildungsordnung ; mit dem Plus im Web, Zugangscodex im Buch*. 1. Aufl. München u.a.: Urban & Fischer in Elsevier; 2009.
9. Braun W, Rüter A. Frakturheilung. Morphologische und physiologische Gesichtspunkte. *Unfallchirurg*. 1996;99(1):59-67.
10. Lieberman JR, Friedlaender GE. *Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications*. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2005.
11. Leijten J, Chai YC, Papantoniou I, Geris L, Schrooten J, Luyten FP. Cell based advanced therapeutic medicinal products for bone repair: Keep it simple? *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;84:30-44. doi:10.1016/j.addr.2014.10.025.

12. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Unter Berücksichtigung der Histophysiologie*. Vierte, korrigierte und aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg, Cham: Springer Berlin Heidelberg; Springer International Publishing AG; 1996. Springer-Lehrbuch.
13. Claes L. Biologie und Biomechanik der Osteosynthese und Frakturheilung. *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date*. 2006;1(4):329-341. doi:10.1055/s-2006-944574.
14. Konrads C, Giebel G. Grundlagen der Frakturheilung und Bedeutung für die Osteosynthese. *Chirurgische Allgemeine Zeitung*. 2012;13:468-470.
15. Texhammar R, Colton C. *AO/ASIF Instruments and Implants: A Technical Manual*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1994.
16. Lindsey RW, Gugala Z, Milne E, Sun M, Gannon FH, Latta LL. The efficacy of cylindrical titanium mesh cage for the reconstruction of a critical-size canine segmental femoral diaphyseal defect. *J Orthop Res*. 2006;24(7):1438-1453. doi:10.1002/jor.20154.
17. Schemitsch EH. Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! *J Orthop Trauma*. 2017;31 Suppl 5:S20-S22. doi:10.1097/BOT.0000000000000978.
18. Claes LE, Heigele CA, Neidlinger-Wilke C, et al. Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;(355 Suppl):S132-47. doi:10.1097/00003086-199810001-00015.
19. Claes L, Meyers N, Schülke J, Reitmaier S, Klose S, Ignatius A. The mode of interfragmentary movement affects bone formation and revascularization after callus distraction. *PLoS ONE*. 2018;13(8):e0202702. doi:10.1371/journal.pone.0202702.
20. Nauth A, McKee MD, Einhorn TA, Watson JT, Li R, Schemitsch EH. Managing bone defects. *J Orthop Trauma*. 2011;25(8):462-466. doi:10.1097/BOT.0b013e318224caf0.

21. Le Baron M, Vivona J-P, Maman P, Volpi R, Flecher X. Can the Reamer/Irrigator/Aspirator System replace anterior iliac crest grafting when treating long bone nonunion? *Orthop Traumatol Surg Res.* 2019;105(3):529-533. doi:10.1016/j.otsr.2018.12.011.
22. Sagi HC, Young ML, Gerstenfeld L, Einhorn TA, Tornetta P. Qualitative and quantitative differences between bone graft obtained from the medullary canal (with a Reamer/Irrigator/Aspirator) and the iliac crest of the same patient. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94(23):2128-2135. doi:10.2106/JBJS.L.00159.
23. Quintero AJ, Tarkin IS, Pape H-C. Technical tricks when using the reamer irrigator aspirator technique for autologous bone graft harvesting. *J Orthop Trauma.* 2010;24(1):42-45. doi:10.1097/BOT.0b013e3181b2b4eb.
24. Zalavras CG, Singh A, Patzakis MJ. Novel technique for medullary canal débridement in tibia and femur osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;461:31-34. doi:10.1097/BLO.0b013e318098673f.
25. Lowe JA, Della Rocca GJ, Murtha Y, et al. Complications associated with negative pressure reaming for harvesting autologous bone graft: a case series. *J Orthop Trauma.* 2010;24(1):46-52. doi:10.1097/BOT.0b013e31819c0ccb.
26. Cox G, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Reamer-irrigator-aspirator indications and clinical results: a systematic review. *Int Orthop.* 2011;35(7):951-956. doi:10.1007/s00264-010-1189-z.
27. Baldwin P, Li DJ, Auston DA, Mir HS, Yoon RS, Koval KJ. Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *J Orthop Trauma.* 2019;33(4):203-213. doi:10.1097/BOT.0000000000001420.
28. Haubruck P, Ober J, Heller R, Miska M, Schmidmaier G, Tanner MC. Complications and risk management in the use of the reaming-irrigator-aspirator (RIA) system: RIA is a safe and reliable method in harvesting autologous bone graft. *PLoS ONE.* 2018;13(4). doi:10.1371/journal.pone.0196051.
29. Henkel J, Woodruff MA, Epari DR, et al. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions — A 21st Century Perspective. *Bone Res.* 2013;1(3):216-248. doi:10.4248/BR201303002.

30. Wintermantel E, Ha S-W. *Medizintechnik: Life Science Engineering*. 5th ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009.
31. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008;29(20):2941-2953. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.
32. Hak DJ. The use of osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma. *J Am Acad Orthop Surg*. 2007;15(9):525-536.
33. Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64:72-82. doi:10.1016/j.addr.2012.09.004.
34. Sohn H-S, Oh J-K. Review of bone graft and bone substitutes with an emphasis on fracture surgeries. *Biomater Res*. 2019;23. doi:10.1186/s40824-019-0157-y.
35. Schieker M, Heiss C, Mutschler W. Knochenersatzmaterialien. *Unfallchirurg*. 2008;111(8):613-9; quiz 620. doi:10.1007/s00113-008-1489-6.
36. Bauer TW, Mutschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res*. 2000;(371):10-27.
37. Schmidt-Rohlfing B, Tzioupis C, Menzel CL, Pape HC. Tissue Engineering von Knochengewebe: Prinzipien und klinische Anwendungsmöglichkeiten. *Unfallchirurg*. 2009;112(9):785-94; quiz 795. doi:10.1007/s00113-009-1695-x.
38. Antoniac I, ed. *Bioceramics and biocomposites: From research to clinical practice*. Hoboken, New Jersey: Wiley; 2019.
39. Katz JM, Nataraj C, Jaw R, Deigl E, Bursac P. Demineralized bone matrix as an osteoinductive biomaterial and in vitro predictors of its biological potential. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2009;89(1):127-134. doi:10.1002/jbm.b.31195.
40. Solves P, Mirabet V, Alvarez M. Hepatitis B transmission by cell and tissue allografts: How safe is safe enough? *World J Gastroenterol*. 2014;20(23):7434-7441. doi:10.3748/wjg.v20.i23.7434.

41. Transmission of HIV Through Bone Transplantation: Case Report and Public Health Recommendations. *JAMA*. 1988;260(17):2487. doi:10.1001/jama.1988.03410170027009.
42. Buck BE, Malinin TI, Brown MD. Bone transplantation and human immunodeficiency virus. An estimate of risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Clin Orthop Relat Res*. 1989;(240):129-136.
43. Tomford WW. Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. *J Bone Joint Surg Am*. 1995;77(11):1742-1754. doi:10.2106/00004623-199511000-00017.
44. Mroz TE, Joyce MJ, Steinmetz MP, Lieberman IH, Wang JC. Musculoskeletal allograft risks and recalls in the United States. *J Am Acad Orthop Surg*. 2008;16(10):559-565.
45. Lomas R, Chandrasekar A, Board TN. Bone allograft in the U.K.: perceptions and realities. *Hip Int*. 2013;23(5):427-433. doi:10.5301/hipint.5000018.
46. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84(3):454-464. doi:10.2106/00004623-200203000-00020.
47. Long WG de, Einhorn TA, Koval K, et al. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J Bone Joint Surg Am*. 2007;89(3):649-658. doi:10.2106/JBJS.F.00465.
48. Tadic D, Epple M. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials*. 2004;25(6):987-994. doi:10.1016/s0142-9612(03)00621-5.
49. Neto AS, Ferreira JMF. Synthetic and Marine-Derived Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials (Basel)*. 2018;11(9). doi:10.3390/ma11091702.
50. Cadosch D, Chan E, Gautschi OP, Filgueira L. Metal is not inert: role of metal ions released by biocorrosion in aseptic loosening--current concepts. *J Biomed Mater Res A*. 2009;91(4):1252-1262. doi:10.1002/jbm.a.32625.
51. Thomsen M, Thomas P. Verträglichkeit und Allergie von Osteosynthesematerialien. *Unfallchirurg*. 2017;120(2):116-121. doi:10.1007/s00113-016-0309-7.

52. Liu Y, Zhu H, Hong H, Wang W, Liu F. Can zinc protect cells from the cytotoxic effects of cobalt ions and nanoparticles derived from metal-on-metal joint arthroplasties? *Bone Joint Res.* 2018;6(12):649-655. doi:10.1302/2046-3758.612.BJR-2016-0137.R2.
53. Savarino L, Granchi D, Ciapetti G, et al. Ion release in patients with metal-on-metal hip bearings in total joint replacement: a comparison with metal-on-polyethylene bearings. *J Biomed Mater Res.* 2002;63(5):467-474. doi:10.1002/jbm.10299.
54. Eldesoqi K, Henrich D, El-Kady AM, et al. Safety Evaluation of a Bioglass–Polylactic Acid Composite Scaffold Seeded with Progenitor Cells in a Rat Skull Critical-Size Bone Defect. *PLoS ONE.* 2014;9(2). doi:10.1371/journal.pone.0087642.
55. Eldesoqi K, Seebach C, Nguyen Ngoc C, et al. High Calcium Bioglass Enhances Differentiation and Survival of Endothelial Progenitor Cells, Inducing Early Vascularization in Critical Size Bone Defects. *PLoS ONE.* 2013;8(11). doi:10.1371/journal.pone.0079058.
56. Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CXF, Tan KC, Lim TC. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007;1(4):245-260. doi:10.1002/term.24.
57. Paul K, Padalhin AR, Linh NTB, Kim B, Sarkar SK, Lee BT. A Study of BMP-2-Loaded Bipotential Electrolytic Complex around a Biphasic Calcium Phosphate-Derived (BCP) Scaffold for Repair of Large Segmental Bone Defect. *PLoS ONE.* 2016;11(10):e0163708. doi:10.1371/journal.pone.0163708.
58. Hussain A, Takahashi K, Sonobe J, Tabata Y, Bessho K. Bone Regeneration of Rat Calvarial Defect by Magnesium Calcium Phosphate Gelatin Scaffolds with or without Bone Morphogenetic Protein-2. *J Maxillofac Oral Surg.* 2014;13(1):29-35. doi:10.1007/s12663-013-0478-7.
59. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(1):45-54. doi:10.1038/nrrheum.2014.164.
60. Breusch SJ, Kühn K-D. Knochenzemente auf Basis von Polymethylmethacrylat. *Orthopade.* 2003;32(1):41-50. doi:10.1007/s00132-002-0411-0.

61. Kurtz SM. *The UHMWPE Handbook: Ultra-High Molecular Weight Polyethylene in Total Joint Replacement*. Saint Louis: Elsevier Science; 2004.
62. Poh PSP, Chhaya MP, Wunner FM, et al. Polylactides in additive biomanufacturing. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;107:228-246. doi:10.1016/j.addr.2016.07.006.
63. Smith JO, Tayton ER, Khan F, et al. Large animal in vivo evaluation of a binary blend polymer scaffold for skeletal tissue-engineering strategies; translational issues. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015;11(4):1065-1076. doi:10.1002/term.2007.
64. Holzapfel BM, Chhaya MP, Melchels FPW, et al. Can Bone Tissue Engineering Contribute to Therapy Concepts after Resection of Musculoskeletal Sarcoma? *Sarcoma.* 2013;2013. doi:10.1155/2013/153640.
65. Janko M, Sahm J, Schaible A, et al. Comparison of three different types of scaffolds preseeded with human bone marrow mononuclear cells on the bone healing in a femoral critical size defect model of the athymic rat. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018;12(3):653-666. doi:10.1002/term.2484.
66. Kim J, Magno MHR, Ortiz O, et al. Next-generation resorbable polymer scaffolds with surface-precipitated calcium phosphate coatings. *Regen Biomater.* 2015;2(1):1-8. doi:10.1093/rb/rbu019.
67. Vergnol G, Ginsac N, Rivory P, et al. In vitro and in vivo evaluation of a polylactic acid-bioactive glass composite for bone fixation devices. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2016;104(1):180-191. doi:10.1002/jbm.b.33364.
68. Tayton E, Purcell M, Smith JO, et al. The scale-up of a tissue engineered porous hydroxyapatite polymer composite scaffold for use in bone repair: an ovine femoral condyle defect study. *J Biomed Mater Res A.* 2015;103(4):1346-1356. doi:10.1002/jbm.a.35279.
69. Park Y-W, Kang H-S, Lee J-H. Comparative study on long-term stability in mandibular sagittal split ramus osteotomy: hydroxyapatite/poly-L-lactide mesh versus titanium miniplate. *Maxillofac Plast Reconstr Surg.* 2019;41(1). doi:10.1186/s40902-019-0192-6.

70. Petersen A, Princ A, Korus G, et al. A biomaterial with a channel-like pore architecture induces endochondral healing of bone defects. *Nat Commun.* 2018;9(1):4430. doi:10.1038/s41467-018-06504-7.
71. Holzapfel BM, Rudert M, Hutmacher DW. Gerüstträgerbasiertes Knochen-Tissue-Engineering. *Orthopade.* 2017;46(8):701-710. doi:10.1007/s00132-017-3444-0.
72. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993;260(5110):920-926. doi:10.1126/science.8493529.
73. He X, Dziak R, Yuan X, et al. BMP2 genetically engineered MSCs and EPCs promote vascularized bone regeneration in rat critical-sized calvarial bone defects. *PLoS ONE.* 2013;8(4):e60473. doi:10.1371/journal.pone.0060473.
74. Peters EB. Endothelial Progenitor Cells for the Vascularization of Engineered Tissues. *Tissue Eng Part B Rev.* 2018;24(1):1-24. doi:10.1089/ten.TEB.2017.0127.
75. Seebach C, Henrich D, Kähling C, et al. Endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells seeded onto beta-TCP granules enhance early vascularization and bone healing in a critical-sized bone defect in rats. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(6):1961-1970. doi:10.1089/ten.TEA.2009.0715.
76. Seebach C, Henrich D, Wilhelm K, Barker JH, Marzi I. Endothelial progenitor cells improve directly and indirectly early vascularization of mesenchymal stem cell-driven bone regeneration in a critical bone defect in rats. *Cell Transplant.* 2012;21(8):1667-1677. doi:10.3727/096368912X638937.
77. Lavrentieva A, Hatlapatka T, Neumann A, Weyand B, Kasper C. Potential for osteogenic and chondrogenic differentiation of MSC. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2013;129:73-88. doi:10.1007/10_2012_133.
78. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001;10 Suppl 2:S96-101. doi:10.1007/s005860100282.
79. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials.* 2000;21(23):2335-2346. doi:10.1016/S0142-9612(00)00101-0.

80. Lewallen EA, Riester SM, Bonin CA, et al. Biological strategies for improved osseointegration and osteoinduction of porous metal orthopedic implants. *Tissue Eng Part B Rev.* 2015;21(2):218-230. doi:10.1089/ten.TEB.2014.0333.
81. Horch H-H, Pautke C. Regeneration statt Reparatur: Eine kritische Bewertung des autogenen Knochentransplantates als "Goldstandard" bei der rekonstruktiven Chirurgie im Kieferbereich. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2006;10(4):213-220. doi:10.1007/s10006-006-0004-x.
82. Ignatius AA, Betz O, Augat P, Claes LE. In vivo investigations on composites made of resorbable ceramics and poly(lactide) used as bone graft substitutes. *J Biomed Mater Res.* 2001;58(6):701-709. doi:10.1002/jbm.10024.
83. Klenke FM, Liu Y, Yuan H, Hunziker EB, Siebenrock KA, Hofstetter W. Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. *J Biomed Mater Res A.* 2008;85(3):777-786. doi:10.1002/jbm.a.31559.
84. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 2005;26(27):5474-5491. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.02.002.
85. Bose S, Vahabzadeh S, Bandyopadhyay A. Bone tissue engineering using 3D printing. *Materials Today.* 2013;16(12):496-504. doi:10.1016/j.mat-tod.2013.11.017.
86. Otsuki B, Takemoto M, Fujibayashi S, Neo M, Kokubo T, Nakamura T. Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: three-dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants. *Biomaterials.* 2006;27(35):5892-5900. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.08.013.
87. Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus.* 2001;10(4):E1. doi:10.3171/foc.2001.10.4.2.
88. Amini AR, Nukavarapu SP. Oxygen-tension controlled matrices for enhanced osteogenic cell survival and performance. *Ann Biomed Eng.* 2014;42(6):1261-1270. doi:10.1007/s10439-014-0990-z.

89. Volkmer E, Drosse I, Otto S, et al. Hypoxia in static and dynamic 3D culture systems for tissue engineering of bone. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(8):1331-1340. doi:10.1089/ten.tea.2007.0231.
90. Jahangir S, Hosseini S, Mostafaei F, Sayahpour FA, Baghaban Eslaminejad M. 3D-porous β -tricalcium phosphate-alginate-gelatin scaffold with DMOG delivery promotes angiogenesis and bone formation in rat calvarial defects. *J Mater Sci Mater Med*. 2018;30(1):1. doi:10.1007/s10856-018-6202-x.
91. Shrivats AR, McDermott MC, Hollinger JO. Bone tissue engineering: state of the union. *Drug Discov Today*. 2014;19(6):781-786. doi:10.1016/j.drudis.2014.04.010.
92. Charles W. Hull, inventor; UVP INC. Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography. USA US4575330A.
93. Carl R. Deckard, Joseph J. Beaman, James F. Darrah, inventor. Method for selective laser sintering with layerwise cross-scanning. US5155324A.
94. S. Scott Crump, inventor; Stratasys Inc. Apparatus and method for creating three-dimensional objects. US5121329A.
95. Jones R, Haufe P, Sells E, et al. RepRap – the replicating rapid prototyper. *Robotica*. 2011;29(1):177-191. doi:10.1017/S026357471000069X.
96. Yaman U. Shrinkage compensation of holes via shrinkage of interior structure in FDM process. *Int J Adv Manuf Technol*. 2018;94(5-8):2187-2197. doi:10.1007/s00170-017-1018-2.
97. Kramer TR, Proctor FM, Messina ER. The NIST RS274NGC Interpreter - Version 3 | NIST. *NIST Interagency/Internal Report (NISTIR) - 6556*. 2000. https://tsapps.nist.gov/publication/get_pdf.cfm?pub_id=823374.
98. Prater T, Werkheiser N, Ledbetter F, Timucin D, Wheeler K, Snyder M. 3D Printing in Zero G Technology Demonstration Mission: complete experimental results and summary of related material modeling efforts. *Int J Adv Manuf Technol*. 2019;101(1):391-417. doi:10.1007/s00170-018-2827-7.
99. Tahayeri A, Morgan M, Fugolin AP, et al. 3D Printed Versus Conventionally Cured Provisional Crown and Bridge Dental Materials. *Dent Mater*. 2017;34(2):192-200. doi:10.1016/j.dental.2017.10.003.

100. Choi JW, Kim N. Clinical Application of Three-Dimensional Printing Technology in Craniofacial Plastic Surgery. *Arch Plast Surg*. 2015;42(3):267-277. doi:10.5999/aps.2015.42.3.267.
101. Fang C, Cai H, Kuong E, et al. Surgical applications of three-dimensional printing in the pelvis and acetabulum: from models and tools to implants. *Unfallchirurg*. 2019;122(4):278-285. doi:10.1007/s00113-019-0626-8.
102. Kai CC, Jacob GGK, Mei T. Interface between CAD and Rapid Prototyping systems. Part 2: LMI ? An improved interface. *Int J Adv Manuf Technol*. 1997;13(8):571-576. doi:10.1007/BF01176301.
103. Störmann P, Kupsch J, Kontradowitz K, et al. Cultivation of EPC and co-cultivation with MSC on β -TCP granules in vitro is feasible without fibronectin coating but influenced by scaffolds' design. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2019;45(3):527-538. doi:10.1007/s00068-018-0935-6.
104. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-1108.
105. Hafsa MN, Ibrahim M, Wahab MS, Zahid MS. Evaluation of FDM Pattern with ABS and PLA Material. *AMM*. 2013;465-466:55-59. doi:10.4028/www.scientific.net/AMM.465-466.55.
106. Bland E, Dréau D, Burg KJL. Overcoming hypoxia to improve tissue-engineering approaches to regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013;7(7):505-514. doi:10.1002/term.540.
107. Malda J, Klein TJ, Upton Z. The roles of hypoxia in the in vitro engineering of tissues. *Tissue Eng*. 2007;13(9):2153-2162. doi:10.1089/ten.2006.0417.
108. Shiu HT, Goss B, Lutton C, Crawford R, Xiao Y. Formation of blood clot on biomaterial implants influences bone healing. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014;20(6):697-712. doi:10.1089/ten.TEB.2013.0709.
109. Kellner K, Liebsch G, Klimant I, et al. Determination of oxygen gradients in engineered tissue using a fluorescent sensor. *Biotechnol Bioeng*. 2002;80(1):73-83. doi:10.1002/bit.10352.

110. Chang BS, Lee CK, Hong KS, et al. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials*. 2000;21(12):1291-1298. doi:10.1016/s0142-9612(00)00030-2.
111. Ripamonti U. Functionalized Surface Geometries Induce: “Bone: Formation by Autoinduction”. *Front Physiol*. 2018;8. doi:10.3389/fphys.2017.01084.
112. Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM, Meijer G, van Blitterswijk CA, Groot K de. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*. 2005;26(17):3565-3575. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.09.056.
113. Bergmann G, Bender A, Dymke J, Duda G, Damm P. Standardized Loads Acting in Hip Implants. *PLoS ONE*. 2016;11(5). doi:10.1371/journal.pone.0155612.
114. Cutiongco MFA, Choo RKT, Shen NJX, et al. Composite Scaffold of Poly(Vinyl Alcohol) and Interfacial Polyelectrolyte Complexation Fibers for Controlled Biomolecule Delivery. *Front Bioeng Biotechnol*. 2015;3. doi:10.3389/fbioe.2015.00003.
115. García-Alvarez R, Izquierdo-Barba I, Vallet-Regí M. 3D scaffold with effective multidrug sequential release against bacteria biofilm. *Acta Biomater*. 2017;49:113-126. doi:10.1016/j.actbio.2016.11.028.
116. Song Y, Lin K, He S, et al. Nano-biphasic calcium phosphate/polyvinyl alcohol composites with enhanced bioactivity for bone repair via low-temperature three-dimensional printing and loading with platelet-rich fibrin. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:505-523. doi:10.2147/IJN.S152105.
117. Yoon ST, Boden SD. Osteoinductive molecules in orthopaedics: basic science and preclinical studies. *Clin Orthop Relat Res*. 2002;(395):33-43. doi:10.1097/00003086-200202000-00005.
118. Decambron A, Fournet A, Bensidhoum M, et al. Low-dose BMP-2 and MSC dual delivery onto coral scaffold for critical-size bone defect regeneration in sheep. *J Orthop Res*. 2017;35(12):2637-2645. doi:10.1002/jor.23577.

119. Liu H, Slamovich EB, Webster TJ. Less harmful acidic degradation of poly(lactico-glycolic acid) bone tissue engineering scaffolds through titania nanoparticle addition. *Int J Nanomedicine*. 2006;1(4):541-545.
120. Tyler B, Gullotti D, Mangraviti A, Utsuki T, Brem H. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;107:163-175. doi:10.1016/j.addr.2016.06.018.
121. Bergsma JE, Bruijn WC de, Rozema FR, Bos RR, Boering G. Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials*. 1995;16(1):25-31. doi:10.1016/0142-9612(95)91092-d.
122. Cai H, Dave V, Gross RA, McCarthy SP. Effects of physical aging, crystallinity, and orientation on the enzymatic degradation of poly(lactic acid). *J. Polym. Sci. B Polym. Phys*. 1996;34(16):2701-2708. doi:10.1002/(SICI)1099-0488(19961130)34:16<2701:AID-POLB2>3.0.CO;2-S.
123. Niaounakis M, Kontou E, Xanthis M. Effects of aging on the thermomechanical properties of poly(lactic acid). *J. Appl. Polym. Sci*. 2011;119(1):472-481. doi:10.1002/app.32644.
124. Pelley J. Safety Standards Aim to Rein in 3-D Printer Emissions. *ACS Cent Sci*. 2018;4(2):134-136. doi:10.1021/acscentsci.8b00090.
125. TOXNET Toxicology Data Network. <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+195>. Accessed August 14, 2019.
126. Humberto Valencia C. Hydrolytic degradation and in vivo resorption of poly-l-lactic acid-chitosan biomedical devices in the parietal bones of Wistar rats. *J Int Med Res*. 2019;47(4):1705-1716. doi:10.1177/0300060519828935.
127. Raise 3D Technologies I. <https://www.raise3d.com/pro2/>. Accessed August 27, 2019.
128. Grémare A, Guduric V, Bareille R, et al. Characterization of printed PLA scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2018;106(4):887-894. doi:10.1002/jbm.a.36289.

129. Madera-Santana TJ, Meléndrez R, González-García G, Quintana-Owen P, Pillai SD. Effect of gamma irradiation on physicochemical properties of commercial poly(lactic acid) clamshell for food packaging. *Radiation Physics and Chemistry*. 2016;C(123):6-13. doi:10.1016/j.radphyschem.2016.02.001.
130. Neches RY, Flynn KJ, Zaman L, Tung E, Pudlo N. On the intrinsic sterility of 3D printing. *PeerJ*. 2016;4. doi:10.7717/peerj.2661.
131. Duan B, Wang M, Zhou WY, Cheung WL, Li ZY, Lu WW. Three-dimensional nanocomposite scaffolds fabricated via selective laser sintering for bone tissue engineering. *Acta Biomater*. 2010;6(12):4495-4505. doi:10.1016/j.actbio.2010.06.024.
132. Wang X, Tolba E, Schröder HC, et al. Effect of bioglass on growth and biomineralization of SaOS-2 cells in hydrogel after 3D cell bioprinting. *PLoS ONE*. 2014;9(11):e112497. doi:10.1371/journal.pone.0112497.
133. Lee JW, Kim YH, Park KD, Jee KS, Shin JW, Hahn SB. Importance of integrin beta1-mediated cell adhesion on biodegradable polymers under serum depletion in mesenchymal stem cells and chondrocytes. *Biomaterials*. 2004;25(10):1901-1909. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.08.037.
134. Heather G. Silverman, Francisco F. Roberto, inventor. Cloning and expression of recombinant adhesive protein Mefp-1 of the blue mussel, *Mytilus edulis*. US6987170B1.
135. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*. 1997;64(2):295-312.
136. Peters A, Toben D, Lienau J, et al. Locally applied osteogenic predifferentiated progenitor cells are more effective than undifferentiated mesenchymal stem cells in the treatment of delayed bone healing. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(10):2947-2954. doi:10.1089/ten.TEA.2009.0058.
137. Weiss MJ, Ray K, Henthorn PS, Lamb B, Kadesch T, Harris H. Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem*. 1988;263(24):12002-12010.

138. Isoenzyme der alkalischen Phosphatase. *Dtsch med Wochenschr.* 1969;94(11):526-529. doi:10.1055/s-0028-1108984.
139. Ashton BA, DeLuca HF, Dulce H-J, et al., eds. *Klinische Osteologie · A.* Fünfte, völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1980. Handbuch der inneren Medizin; 6 / 1.
140. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(1):a004978. doi:10.1101/cshperspect.a004978.
141. Huang Y-Z, Cai J-Q, Xue J, et al. The poor osteoinductive capability of human acellular bone matrix. *Int J Artif Organs.* 2012;35(12):1061-1069. doi:10.5301/ijao.5000122.
142. Shi X, Zhou K, Huang F, Zhang J, Wang C. Endocytic mechanisms and osteoinductive profile of hydroxyapatite nanoparticles in human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:1457-1470. doi:10.2147/IJN.S155814.
143. Zhang J, Liu W, Schnitzler V, Tancret F, Bouler J-M. Calcium phosphate cements for bone substitution: chemistry, handling and mechanical properties. *Acta Biomater.* 2014;10(3):1035-1049. doi:10.1016/j.actbio.2013.11.001.
144. Köhn J. *Entwicklung eines thermisch stabilen und flexiblen Polymers auf Basis von PLA für medizinische Anwendungen*; 2015.

8 Anhang

Anhang 1: Konformitätserklärung PLA 3dk.berlin



Bernhardt Kunststoffverarbeitungs GmbH
Ruppiner Chaussee 325
13503 Berlin

Telefon: +49 (0)30 – 437 48 15 4
Fax: +49 (0)30 – 437 48 15 9

E-Mail: info@3dk.berlin
Web: www.3dk.berlin

KONFORMITÄTSERKLÄRUNG nach DIN EN ISO/IEC 17050-1 Unbedenklichkeitserklärung für Lebensmittelbedarfsgegenstände

für **PLA-Filament**

Das oben beschriebene Produkt ist konform mit den Anforderungen der folgenden Dokumente:

- EU-Verordnung 1935/2004/EC entsprechend der EU-Richtlinie 10/2011 und der Änderung (EU) Nr. 202/2014
- DIN EN 71 Teil 3 : 2002-11
- Bedarfsgegenstände-Verordnung (BedGgsV)
- Lebensmittel und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) vom 01.09.2005
- Verordnungen (EC) 178/2002 und 2023/2008

Die eingesetzten Monomere und Additive für unser PLA-Filament sind in der EU-Verordnung 1935/2004/EC entsprechend der EU-Richtlinie 10/2011 und der Änderung (EU) Nr. 202/2014 gelistet, die in nationales Recht der EU Mitgliedsstaaten überführt wurden.

Sofern bestimmte Additive und Pigmente in unserem Filament enthalten sind, die bisher noch nicht unter die Richtlinie fallen, entsprechen sie dem letzten Stand der Empfehlungen der Kunststoffkommission – Kunststoffrichtlinie 2002/72/EC.

- XVII für Polyterephthalsäurediolester vom 01.01.02
- IX für Farbstoffe zum Einfärben von Kunststoffen vom 01.06.94 beziehungsweise der korrespondierenden Empfehlung der europäischen Union (Council of Europe) AP (89) 1.

Die in der RoHS – Richtlinie genannten gefährlichen Inhaltsstoffe bromierte Flammschutzmittel (PBB, PBDE), Decabromdiphenylether (DecaBDE) sowie TBBP-A, HBCDD, DEHP, BBP, DBP, SCCP und MCCP sind weder Bestandteil der Rezeptur noch in dem gelieferten Filament enthalten.

Die EULIPA-Leitlinie findet bei nicht bedruckten Materialien keine Anwendung. Dementsprechend kommen keine Stoffe aus der TDI-Gruppe (Benzophenon, 4-Hydroxybenzophenon, 4-Methylbenzophenon und 2,2'-Dimethoxy-2-phenylacetophenon) auf den Filamentoberflächen zur Anwendung

Durch die Einhaltung der genannten Vorschriften ist unsere Sorgfaltspflicht in Bezug auf die lebensmittelrechtliche Unbedenklichkeit der von uns gelieferten Filamenten erfüllt. Der Empfänger unserer Produkte hat selbst zu prüfen, ob das vorgesehene Anwendung für diese Materialien geeignet ist. Für Schäden haften wir nicht, wenn diese Prüfpflicht nicht erfüllt wurde. Wir informieren Sie über Änderungen in der Zusammensetzung unserer Filamente, sofern diese lebensmittelrechtlich von Bedeutung sind.

Alle bis jetzt abgegebenen Unbedenklichkeitserklärungen für das oben genannte Filament verlieren hiermit ihre Gültigkeit.

Berlin, den 16.06.2017

Volker Bernhardt



Ingeo™ Biopolymer Technical Data Sheet

For Fresh Food Packaging and Food Serviceware

Ingeo biopolymer, a NatureWorks LLC product, is a thermoplastic resin derived from annually renewable resources and is specifically designed for use in fresh food packaging and food serviceware applications. Ingeo biopolymer is a transparent general purpose extrusion grade that is used naturally or as part of a formulated blend. This is a high molecular weight biopolymer grade that processes easily on conventional extrusion equipment. Extruded roll stock is readily thermoformable. See table at right for properties.

Applications

Potential applications for Ingeo biopolymer include:

- Dairy containers
- Food serviceware
- Transparent food containers
- Hinged-ware
- Cold drink cups

Processing Information

Ingeo biopolymer is easily processed on conventional extrusion equipment. The material is stable in the molten state, provided that the drying procedures are followed. More detailed recommendations and processing requirements are found in the Ingeo biopolymer sheet extrusion processing guide, the purging technical data sheet, and the drying and crystallizing processing guide, all of which can be found at www.natureworksilc.com.

Machine Configuration

Ingeo biopolymer will process on conventional extrusion machinery with the following equipment: General purpose screw with L/D ratios from 24:1 to 32:1 and compression ratio of

Typical Material & Application Properties ⁽¹⁾	
Physical Properties Ingeo ASTM Method	
Specific Gravity	1.24 D792
MFR, g/10 min (210°C, 2.16kg)	6 D1238
Clarity	Transparent
Mechanical Properties	
Tensile Strength @ Break, psi (MPa)	7,700 (53) D882
Tensile Yield Strength, psi (MPa)	8,700 (60) D882
Tensile Modulus, kpsi (GPa)	500 (3.5) D882
Tensile Elongation, %	6.0 D882
Notched Izod Impact, ft-lb/in (J/m)	0.3 (16) D256
Shrinkage is similar to PET ⁽²⁾	
Heat Distortion Temperature (°C)	55 E2092

(1) Typical properties; not to be construed as specifications.

(2) Refer to Ingeo biopolymer Sheet Extrusion Processing Guide

2.5:1 to 3:1. Smooth barrels are recommended.

Process Details

Startup and Shutdown

Ingeo biopolymer is not compatible with a wide variety of commodity resins, and special

purging sequences should be followed:

1. Clean extruder and bring temperatures to steady state with low viscosity, general purpose polystyrene or polypropylene.
2. Vacuum out hopper system to avoid contamination.
3. Introduce Ingeo biopolymers into the extruder at the operating conditions used in Step 1.
4. Once Ingeo biopolymer has purged, reduce barrel temperatures to desired set points.
5. At shutdown, purge machine with high viscosity polystyrene or polypropylene.

Drying

In-line drying may be required. A moisture content of less than 0.025%

Processing Temperature Profile ⁽¹⁾	
Melt Temperature	410°F 210°C
Feed Throat	113°F 45°C
Feed Temperature	355°F 180°C
Compression Section	375°F 190°C
Metering Section	390°F 200°C
Adapter	390°F 200°C
Die	375°F 190°C
Screw Speed	20-100 rpm

(1) These are starting points and may need to be optimized.

(250 ppm) is recommended to prevent viscosity degradation. Typical drying conditions for crystallized granules are 2 hours at 195°F (90°C) or to a dew point of -40°F (-40°C), airflow rate of greater than 0.5 cfm/lbs per hour of resin throughput. The resin should not be exposed to atmospheric conditions after drying. Keep the package sealed until ready to use and promptly reseal any unused material. Pellets that have been exposed to the atmosphere for extended time periods will require additional drying time. Amorphous regrind must be crystallized prior to drying, to assure efficient and effective drying.

Ingeo Biopolymer Technical Data Sheet

Compostability

Composting is a method of waste disposal that allows organic materials to be recycled into a product that can be used as a valuable soil amendment. Ingeo biopolymer is made of polylactic acid, a repeating chain of lactic acid, which undergoes a 2-step degradation process. First, the moisture and heat in the compost pile attack the polymer chains and split them apart, creating smaller polymers, and finally, lactic acid. Microorganisms in compost and soil consume the smaller polymer fragments and lactic acid as nutrients. Since lactic acid is widely found in nature, a large number of organisms metabolize lactic acid. At a minimum, fungi and bacteria participate in this degradation process. The end result of the process is carbon dioxide, water and also humus, a soil nutrient. This degradation process is temperature and humidity dependent. Regulatory guidelines and standards for composting revolve around four basic criteria: Material Characteristics, Biodegradation, Disintegration, and Ecotoxicity. Description of the requirements of these testing can be found in the appropriate geographical area: DIN V 54900-1 (Germany), EN 13432 (EU), ASTM D 6400 (USA), GreenPla (Japan). This grade of Ingeo biopolymer meets the requirements of these four standards with limitation of maximum thickness 3.2mm.

Food Packaging Status

U.S. Status

On January 3, 2002 FCN 000178 submitted by NatureWorks LLC to FDA became effective. This effective notification is part of list currently maintained on FDA's website at

<http://www.fda.gov/food/ingredientpackaginglabeling/packagingfcs/notifications/default.htm>

This grade of Ingeo biopolymer may therefore be used in food packaging materials and, as such, is a permitted

component of such materials pursuant to section 201(s) of the Federal, Drug, and Cosmetic Act, and Parts 182, 184, and 186 of the Food Additive Regulations. All additives and adjuncts contained in the referenced Ingeo biopolymer formulation meet the applicable sections of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act. The finished polymer is approved for all food types and B-H use conditions. We urge all of our customers to perform GMP (Good Manufacturing Procedures) when constructing a package so that it is suitable for the end use. Again, for any application, should you need further clarification, please do not hesitate to contact NatureWorks LLC.

European Status

This grade of Ingeo biopolymer complies with Plastics Regulation 10/2011 as amended by 1282/2011. No SML's for the above referenced grade exist in Plastics Regulation 10/2011 as amended by 1282/2011. NatureWorks LLC would like to draw your attention to the fact that the EU-Plastics Regulation 10/2011, which applies to all EU-Member States, includes a limit of 10 mg/dm² of the overall migration from finished plastic articles into food. In accordance with Plastics Regulation 10/2011 the migration should be measured on finished articles placed into contact with the foodstuff or appropriate food simulants for a period and at a temperature which are chosen by reference to the contact conditions in actual use, according to the rules laid down in Plastics Regulation 10/2011.

Please note that it is the responsibility of both the manufacturers of finished food contact articles as well as the industrial food packers to make sure that these articles in their actual use are in compliance with the imposed specific and overall migration requirements.

This grade as supplied meets European Parliament and Council Directive 94/62/EC of 20 December

1994 on packaging and packaging waste heavy metal content as described in Article 11. It is recoverable in the form of material recycling, energy recovery, composting, and biodegradable per Annex II point 3, subject to the standards of the local community. Again, for any application, should you need further clarification, please do not hesitate to contact NatureWorks LLC.

Bulk Storage Recommendations

The resin silos recommended and used by NatureWorks LLC are designed to maintain dry air in the silo and to be isolated from the outside air. This design would be in contrast to an open, vented to atmosphere system that we understand to be a typical polystyrene resin silo. Key features that are added to a typical (example: polystyrene) resin silo to achieve this objective include a cyclone and rotary valve loading system and some pressure vessel relief valves. The dry air put to the system is sized to the resin flow rate out of the silo. Not too much dry air would be needed and there may be excess instrument air (-30°F dew point) available in the plant to meet the needs for dry air. Our estimate is 10 scfm for a 20,000 lb/hr rate resin usage. Typically, resin manufacturers specify aluminum or stainless steel silos for their own use and avoid epoxy-lined steel

Ingeo Biopolymer Technical Data Sheet

Safety and Handling Considerations

Material Safety Data (MSD) sheets for Ingeo biopolymers are available from NatureWorks LLC. MSD sheets are provided to help customers satisfy their own handling, safety, and disposal needs, and those that may be required by locally applicable health and safety regulations, such as OSHA (U.S.A.), MAK (Germany), or WHMIS (Canada). MSD sheets are updated regularly; therefore, please request and review the most current MSD sheets before handling or using any product.

The following comments apply only to Ingeo biopolymers; additives and processing aids used in fabrication and other materials used in finishing steps have their own safe-use profile and must be investigated separately.

Hazards and Handling Precautions

Ingeo biopolymers have a very low degree of toxicity and, under normal conditions of use, should pose no unusual problems from incidental ingestion, or eye and skin contact. However, caution is advised when handling, storing, using, or disposing of these resins, and good housekeeping and controlling of dusts are necessary for safe handling of product. Workers should be protected from the possibility of contact with molten resin during fabrication. Handling and fabrication of resins can result in the generation of vapors and dusts that may cause irritation to eyes and the upper respiratory tract. In dusty atmospheres, use an approved dust respirator. Pellets or beads may present a slipping hazard. Good general ventilation of the polymer processing area is recommended. At temperatures exceeding the polymer melt temperature (typically 170°C), polymer can release fumes, which may contain fragments of the polymer, creating a potential to irritate eyes and mucous membranes. Good general ventilation should be sufficient for most conditions.

Local exhaust ventilation is recommended for melt operations. Use safety glasses if there is a potential for exposure to particles which could cause mechanical injury to the eye. If vapor exposure causes eye discomfort, use a full-face respirator. No other precautions other than clean, body-covering clothing should be needed for handling Ingeo biopolymers. Use gloves with insulation for thermal protection when exposure to the melt is localized.

Combustibility

Ingeo biopolymers will burn. Clear to white smoke is produced when product burns. Toxic fumes are released under conditions of incomplete combustion. Do not permit dust to accumulate. Dust layers can be ignited by spontaneous combustion or other ignition sources. When suspended in air, dust can pose an explosion hazard. Firefighters should wear positive-pressure, self-contained breathing apparatuses and full protective equipment. Water or water fog is the preferred extinguishing medium. Foam, alcohol-resistant foam, carbon dioxide or dry chemicals may also be used. Soak thoroughly with water to cool and prevent re-ignition.

Disposal

DO NOT DUMP INTO ANY SEWERS, ON THE GROUND, OR INTO ANY BODY OF WATER. For unused or uncontaminated material, the preferred options include recycling into the process or sending to an industrial composting facility, if available; otherwise, send to an incinerator or other thermal destruction device. For used or contaminated material, the disposal options remain the same, although additional evaluation is required. (For example, in the U.S.A., see 40 CFR, Part 261, "Identification and Listing of Hazardous Waste.") All disposal methods must be in compliance with Federal, State/Provincial, and local laws and regulations.

Environmental Concerns

Generally speaking, lost pellets are not a problem in the environment except under unusual circumstances when they enter the marine environment. They are benign in terms of their physical environmental impact, but if ingested by waterfowl or aquatic life, they may mechanically cause adverse effects. Spills should be minimized, and they should be cleaned up when they happen. Plastics should not be discarded into the ocean or any other body of water.

Product Stewardship

NatureWorks LLC has a fundamental duty to all those that make and use our products, and for the environment in which we live. This duty is the basis for our Product Stewardship philosophy, by which we assess the health and environmental information on our products and their intended use, then take appropriate steps to protect the environment and the health of our employees and the public.

Customer Notice

NatureWorks LLC encourages its customers and potential users of its products to review their applications for such products from the standpoint of human health and environmental quality. To help ensure our products are not used in ways for which they were not intended or tested, our personnel will assist customers in dealing with ecological and product safety considerations. Your sales representative can arrange the proper contacts. NatureWorks LLC literature, including Material Safety Data sheets, should be consulted prior to the use of the company's products. These are available from your NatureWorks LLC representative.

NOTICE: No freedom from any patent owned by NatureWorks LLC or others is to be inferred. Because use conditions and applicable laws may differ from one location to another and may change with time, Customer is responsible for determining whether products and the information in this document are appropriate for Customer's use and for ensuring that Customer's workplace and disposal practices are in compliance with applicable laws and other governmental enactments. NatureWorks LLC assumes no obligation or liability for the information in this document. **NO WARRANTIES ARE GIVEN; ALL IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR USE ARE EXPRESSLY EXCLUDED.**

NOTICE REGARDING PROHIBITED USE RESTRICTIONS: NatureWorks LLC does not recommend any of its products, including samples, for use as: Components of, or packaging for, tobacco products; Components of products where the end product is intended for human or animal consumption; In any application that is intended for any internal contact with human body fluids or body tissues; As a critical component in any medical device that supports or sustains human life; In any product that is designed specifically for ingestion or internal use by pregnant women; and in any application designed specifically to promote or interfere with human reproduction.

For additional information please contact NatureWorks via our [website](#) on the tab called [FAQ's](#) or by clicking [here](#).

 NatureWorks LLC
15305 Minnetonka Blvd., Minnetonka, MN 55345

9 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Jonas Neijhoft
Anschrift: [REDACTED]
Geburtsdatum / -ort 24.11.1992 in Kaiserslautern
Staatsangehörigkeit deutsch
Familienstand ledig

Schulbildung

1999 – 2003 Grundschule Mehlingen
2003 – 2012 Albert-Schweitzer-Gymnasium, Kaiserslautern
03.2012 Abschluss: Abitur mit der Note „sehr gut“ (1,4)

Studium

10.2012 – 09.2019 Studium der Humanmedizin an der Goethe-Universität, Frankfurt a. M.
09.2014 1. Staatsexamen mit der Note „sehr gut“
04.2018 2. Staatsexamen mit der Note „gut“
05.2019 3. Staatsexamen mit der Note „sehr gut“
Abschluss mit der Gesamtnote „sehr gut“

Auslandsaufenthalte

01.2017 - 02.2017 Famulatur im Krankenhaus Litembo Diocesan Hospital, Tansania

Wissenschaftlicher Werdegang

Seit 10.2018 Mitwirken am Rhein-Main-Universitäts-Projekt in Zusammenarbeit mit der TU Darmstadt und der Johannes Gutenberg-Universität Mainz:

- „Entwicklung einer 3D-gedruckten modularen, bioaktiven Gerüststruktur auf PLA-Bioglas-Basis zur Behandlung langstreckiger Defekte in Röhrenknochen“*
- 02.2019 Reisestipendium und Vortrag auf dem Kongress des AFOR Expertengremiums in Pontresina, Schweiz:
„Entwicklung und Realisierung FDM-3D-druckbarer Knochenersatzdesigns“
- 09.2019 Teilnahme an der Fortbildung im Rahmen des Kongresses Additive Manufacturing meets Medicine in Lübeck mit dem Thema:
„Applikationen und Zulassung individualisierter Medizinprodukte - 3D-Druck im medizinischen Umfeld“
- 09.2019 Vortrag auf dem Kongress Chirurgische Forschungstage 2019 in Aachen mit dem Thema:
“Development and realization of innovative scaffold designs with fused-filament-fabrication-3d-printing for use as bone substitutes”
- 02.2020 Reisestipendium und Vortrag auf dem Kongress des AFOR Expertengremiums in Pontresina, Schweiz:
„Point-of-Care 3D-Druck und operative Planung “

Frankfurt, den 20.10.2020

Jonas Neijhoft

10 Danksagung

Abschließend möchte ich den nachstehenden Personen danken, die mir beim Gelingen dieser Arbeit stets unterstützend zur Seite standen.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Ingo Marzi meinen Dank für die freundliche Aufnahme in sein Institut sowie die Unterstützung in jedweder Hinsicht aussprechen. Weiterhin gab er mir die Möglichkeit, bereits während der Durchführung dieser Arbeit auf Kongressen und im wöchentlichen unfallchirurgischen Forschungsseminar teilzunehmen.

Ebenso möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dirk Henrich, für die gemeinsame Ideenfindung, Planung der Versuche und Anleitung in Labortechniken danken. Keine Frage war zu kompliziert, als dass er mir diese nicht mit viel Geduld beantwortete hätte und eine Lösung gefunden wurde.

Frau Katrin Jurida und Frau Kerstin Konradowitz hatten weiterhin stets ein offenes Ohr für Probleme und wiesen mich in die Laborgeräte und Arbeitstechniken ein. Hierfür möchte ich auch Ihnen meinen Dank aussprechen.

Ein weiteres Dankeschön gilt Tobias Viertmann, mit dem ich im Jahr 2012 die ersten Projekte selbst gebauter und entwickelter 3D-Drucker startete und mich dadurch eingehender mit dieser spannenden Materie beschäftigte.

Abschließend möchte ich noch meiner Familie und meinen Freunden, darunter vor allem Sophia Schwab, danken, die immer hinter mir gestanden haben. Sie äußerten stets konstruktive Kritik und halfen vor allem dabei, den Endspurt durchzustehen.

11 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Entwicklung und Realisierung neuer Designs zur Nutzung als Knochenersatzmaterial mittels Fused-Deposition-Modelling-3D-Druck

in der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Klinikums der Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dirk Henrich ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Kongress des AFOR Expertengremiums 2019 in Pontresina, Schweiz

Kongress der Chirurgischen Forschungstage 2019 in Aachen

Materials — Open Access Journal, doi: 10.3390/ma13081836

(Ort, Datum)

(Unterschrift)