

Ultra-schnell aushärtende Hydrogele als Biotinten für den 3D-Biodruck

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Sonja Katharina Haase

aus

Achern, Deutschland

1. Referentin: Prof. Dr. Ute Schepers

2. Referent: Prof. Dr. Matthias Franzreb

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2020

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. Ute Schepers von Oktober 2017 bis Oktober 2020 am Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT, Campus Nord) angefertigt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtlich und inhaltlich übernommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der gültigen Fassung wurde beachtet.

Wenn ich weiter sehen konnte, so deshalb,
weil ich auf den Schultern von Riesen stand

Isaac Newton

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Entwicklung artifizierter Gewebe.....	3
2.2 3D-Biodruckmethoden	5
2.3 Biotinten.....	7
2.3.1 Anforderungen.....	7
2.3.2 Hydrogele	9
2.4 <i>Organ-on-a-Chip</i> -Systeme	16
3 Zielsetzung	18
4 Ergebnisse	19
4.1 Synthese und Charakterisierung der Photopolymere	19
4.1.1 Gelatine.....	19
4.1.2 GelMA-V1.....	21
4.1.3 GelMA-V2.....	25
4.1.4 GelNB.....	28
4.1.5 GelS	32
4.2 Charakterisierung der Photoinitiatoren und Crosslinker	35
4.2.1 Absorptionsspektren der Photoinitiatoren	35
4.2.2 Zytotoxizität der Photoinitiatoren.....	36
4.2.3 Zytotoxizität DTT	40
4.3 Charakterisierung der Aushärtungsbedingungen	42
4.3.1 Bestrahlungstoxizität	42
4.3.2 Polymerisationszeiten.....	45
4.4 Charakterisierung der Hydrogele	54
4.4.1 Sterilität	55
4.4.2 Quelleigenschaften.....	56
4.4.3 Degradationsverhalten	60

4.4.4 Rheologische Charakterisierung der Polymerlösungen	63
4.4.5 Rheologische Charakterisierung der vernetzten Hydrogele	71
4.4.6 Rheologische Charakterisierung zellbeladener Hydrogele.....	81
4.5 Charakterisierung der Biokompatibilität der Hydrogele.....	84
4.5.1 3D-Zelleinbettung	85
4.5.2 Proliferationsverhalten eingekapselter Zellen	126
4.5.3 3D-Einbettung von Stammzellen	132
4.6 3D-Biodruck	134
4.6.1 Optimierung des Extrusionsdruckprozesses.....	135
4.6.2 Evaluierung des Scherstress bei Extrusionsdruckprozessen	140
4.6.3 Extrusionsdruck zellbeladener Hydrogele.....	146
4.6.4 3D-Druck zum Aufbau eines Blut-Hirn-Schranke-Modells auf einem <i>Organ-on-a-Chip</i> System.....	157
4.6.5 Verwendung von GeINB/GeIS als Matrix für die Herstellung von Knorpelgewebe	163
5 Diskussion	164
6 Material und Methoden	173
6.1 Material.....	173
6.1.1 Verwendete Zelllinien/ Primärzellen.....	173
6.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	173
6.1.3 Zusammengesetzte Chemikalien/Medien	175
6.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	176
6.1.5 Geräte	178
6.1.6 Software	179
6.2 Methoden.....	180
6.2.1 Zellkultur HepG2	180
6.2.2 Zellkultur NHDF	180
6.2.3 Zellkultur HUVEC	181
6.2.4 Chemische Synthese der Photopolymere.....	182
6.2.5 Charakterisierung der Photopolymere und Hydrogele	187

6.2.6 MTT-Assay zur Bestimmung der Toxizität von Substanzen	192
6.2.7 MTT-Assay zur Bestimmung der Bestrahlungstoxizität.....	193
6.2.8 Einbettung von Zellen in Hydrogele	193
6.2.9 Lebend/Tot-Färbung zur Bestimmung der Zellviabilität.....	193
6.2.10 Viabilitätsbestimmung der ASC in Hydrogelen.....	194
6.2.11 PrestoBlue-Assay zur Bestimmung der Proliferation.....	195
6.2.12 Zellfärbungen	196
6.2.13 3D-Biodruck.....	196
7 Abkürzungsverzeichnis	202
8 Literatur.....	207
9 Anhang.....	226
9.1 Sterilitätsuntersuchung der Hydrogele	226
9.2 Rheologische Charakterisierung der Hydrogele	228
9.3 Extrusionsdruck zellbeladener Hydrogele	229
10 Danksagung.....	232

1 Zusammenfassung

Bei der Entwicklung neuer Medikamente sind *in vivo* Toxizitätsscreenings potentieller Wirkstoffe grundlegende Bestandteile der Forschung. Um die Anzahl der hierfür benötigten Tierversuche zu minimieren und die Übertragbarkeit der Testergebnisse auf den Menschen zu verbessern, versucht die Wissenschaft durch das *Tissue Engineering* funktionelle dreidimensionale (3D) humane *in vitro* Gewebemodelle zu entwickeln. Eine vielversprechende Methode zur präzisen Rekonstruktion von Gewebemodellen ist der 3D-Biodruck. Bei diesem Verfahren werden Biomaterialien und Zellen gleichzeitig in einem schichtweisen Verfahren in einer definierten Anordnung präzise positioniert, wodurch gezielt 3D-Gewebemodelle generiert werden können. Die Wahl eines geeigneten Materials - einer sogenannten Biotinte - für den Druckprozess ist dabei von entscheidender Bedeutung. Die Biotinte muss zum einen die biologischen Anforderungen der Zellen und zum anderen die physikalischen Anforderungen des 3D-Druckprozesses erfüllen.

Hydrogele ähneln in ihren Eigenschaften der natürlichen extrazellulären Matrix (engl.: *Extracellular matrix*, ECM) und sind daher gut zum Biodruck geeignet, da sie die Einkapselung der Zellen in einer hoch-hydratisierten und mechanisch stabilen 3D-Umgebung gewährleisten. Eine Vielzahl natürlicher und synthetischer Hydrogele steht dabei für Anwendungen im *Tissue Engineering* zur Verfügung. Für den Einsatz der Gele in der medizinischen Forschung muss jedoch eine reproduzierbare Synthese und eine einfache Prozessierung umsetzbar sein. Semi-synthetische Hydrogele vereinen dabei die Anforderungen der reproduzierbaren Synthese mit der für die Gewebebildung wichtigen Bioaktivität. Besonders häufig wird in der Literatur das auf Gelatine basierende semi-synthetische Hydrogel Gelatinemethacrylamid (GelMA) verwendet, das durch eine Photopolymerisation vernetzt wird. Dieses Hydrogel kann besonders einfach synthetisiert werden und ermöglicht die Gewebebildung durch die natürlichen Zellinteraktionsdomänen der Gelatine. Jedoch sind zur Vernetzung von GelMA-Hydrogelen große Mengen an Photoinitiator und lange Polymerisationszeiten notwendig. Sowohl die Verwendung hoher Photoinitiator Mengen als auch die Methacrylamidgruppen im GelMA wirken sich negativ auf die Viabilität der eingebetteten Zellen aus. Aus diesen Gründen lag der Fokus dieser Arbeit auf der Herstellung und Charakterisierung neuartiger Gelatine-basierter Hydrogelsysteme, die durch eine einfache, reproduzierbare und prozessorientierte Synthese hergestellt wurden. Gelatine wurde dafür mit Norbornengruppen (GelNB) und Thiolgruppen (GelS) funktionalisiert, um lichtinduzierte Thiol-En Reaktionen für die Vernetzung zum Hydrogel zu erlauben. Dadurch ließ sich die nötige Polymerisationszeit zur Vernetzung der beiden Photopolymere GelNB und GelS im Vergleich zu GelMA deutlich reduzieren. Außerdem konnte die benötigte Menge des für Zellen toxischen Photoinitiators für die Vernetzung der GelNB/GelS-Hydrogele deutlich reduziert werden, ohne dass sich dies auf die Polymerisationszeit auswirkte. Die verschiedenen Hydrogele mit unterschiedlichen Vernetzungsgraden wurden hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen und biologische Eigenschaften umfassend

auf ihre Eignung als Biotinten für den 3D-Biodruck charakterisiert. Die unterschiedlichen Vernetzungsgrade beeinflussten auch das Quell- und Abbauverhalten sowie die viskoelastischen Eigenschaften der Hydrogele. Die Evaluierung der Biokompatibilität zeigte die Eignung aller Hydrogelsysteme für den Einsatz in der 3D-Zellkultur auf. Durch die vorhandenen Adhäsionsdomänen konnten die eingekapselten Zellen in den Hydrogelen proliferieren und dichte Netzwerke ausbilden.

Durch eine temperaturabhängige Druckoptimierung für die einzelnen Hydrogelsysteme im 3D-Biodruckverfahren konnten homogene und gleichzeitig stabile Strukturen gedruckt werden. Dabei konnte eine deutlich höhere Biokompatibilität in Viabilitätsstudien des GelNB/GelS-Hydrogels im Vergleich zu GelMA nachgewiesen werden. Mit Hilfe dieser ultra-schnell aushärtenden Biotinte konnte abschließend ein Modell der humanen Blut-Hirn-Schranke auf einem durchbluteten *Organ-on-a-Chip*-System mit Hilfe des 3D-Biodrucks generiert werden. In weiteren Arbeiten wurden erste Knorpelersatzmaterialien durch Verdrucken von adipösen Stammzellen in Langzeitstudien in der Maus untersucht. In beiden Fällen erwies sich diese ultra-schnell aushärtende Biotinte als hervorragende, industriell prozessierbare Alternative zu herkömmlichen Biotinten.

2 Einleitung

Der rasche Fortschritt im Bereich neuer Technologien zur chemischen Synthese von Molekülen ermöglicht heutzutage den Zugang zu einem breiten Spektrum an neuen potentiellen Wirkstoffkandidaten für die Pharmaindustrie.¹⁻³ Diese müssen dann in Voruntersuchungen an Zellkulturen, sowie anhand von Tierversuchen auf ihre Toxizität und ihr Penetrationsverhalten hin überprüft werden, bevor sie in klinischen Studien am Menschen eingesetzt und ihre Wirkung validiert werden kann.^{4,5} Dieser Prozess ist sehr aufwändig, sodass bis zur Validierung der Wirkstoffe in klinischen Studien mehrere Jahre vergehen. Zudem scheitern 90 % der Wirkstoffkandidaten während dieser Phase aufgrund ihrer Toxizität oder eines unzureichenden therapeutischen Effektes.⁶⁻⁸ Tierversuche sind dabei ein essentieller Bestandteil des Verfahrens zur Validierung der potentiellen Wirkstoffe. Diese sind jedoch sehr kosten- und zeitaufwändig und stellen die physiologischen und metabolischen Abläufe im Menschen häufig nur unzureichend dar.^{9,10} Zusätzlich wird die Notwendigkeit von Tierversuchen heutzutage aus ethischen Gründen immer weiter hinterfragt.¹¹ So wurde deren Einsatz für die Erforschung und Entwicklung von Kosmetika bereits 2009 in der Europäischen Union strikt verboten.¹² Somit ist die Suche nach alternativen Methoden zum Tierversuch in der aktuellen Forschung ein stark diskutiertes Thema.^{13,14}

2.1 Entwicklung artifizieller Gewebe

Das *Tissue Engineering* ist ein interdisziplinäres Feld, das Prinzipien der Ingenieurwissenschaften und der Naturwissenschaften vereint, um funktionelle biologische Ersatzgewebe nachzubilden.¹⁵⁻¹⁷ Mit diesen können dann organspezifische Experimente *in vitro* durchgeführt werden, wodurch die Anzahl der benötigten Tierversuche im Bereich der Wirkstoffentwicklung Schritt für Schritt reduziert werden soll.^{18,19} Das einfachste System, welches bereits zur Charakterisierung von Wirkstoffkandidaten eingesetzt wird, stellen humane zweidimensionale (2D) Gewebemodelle dar.²⁰ Bereits im letzten Jahrhundert wurde deren Potential erkannt und stetig weiterentwickelt.²¹ 2D-Kulturen zeichnen sich durch vergleichsweise niedrige Kosten und eine einfache Reproduzierbarkeit aus.²² Die Zellen wachsen dabei in Form von Monolayern auf Polystyrol oder Glasoberflächen und werden mit Kulturmedium überschichtet, sodass eine gleichmäßige Nährstoffversorgung aller Zellen erreicht wird.²³ Bei der Medikamentenentwicklung hat dies den Vorteil, dass auch die potentiellen Wirkstoffe gleichmäßig im Kulturmedium verteilt sind und die Exposition für alle Zellen der 2D-Schicht identisch ist. Dies vereinfacht zwar die Charakterisierung der Stoffe, spiegelt jedoch die Situation *in vivo* nur bedingt wider.²⁴ Im Organismus liegen die Zellen in einer dreidimensionalen (3D) Anordnung vor und stehen mit verschiedenen Zelltypen und der extrazellulären Matrix (engl.: *Extracellular matrix*, ECM) in Kontakt. Diese besteht aus fibrillären Proteinen wie Fibronectin, Kollagen und Laminin, die der ECM ihre Struktur verleihen. Die Zwischenräume sind mit Proteoglykanen und Wasser ausgefüllt.^{25,26} Die ECM übt dabei nicht nur eine Stützfunktion aus und stabilisiert dadurch die

3D-Anordnung der Zellen, sondern ist auch an Prozessen der Differenzierung, Proliferation, der zellulären Funktion und der Signalweiterleitung beteiligt.²⁷⁻²⁹ Bei der 2D-Kultivierung auf einer Oberfläche sind dagegen die Ausbildung der Adhäsionskontakte und die Polarität der Zelle durch bestimmte Oberflächenbeschichtungen vorgegeben.^{23,30} Zudem führt diese Art der Kultivierung häufig zu einem Verlust der gewebespezifischen Eigenschaften der Zellen. Dazu zählen die Veränderung im Metabolismus der Zellen, der Morphologie und im Differenzierungs- und Proliferationsverhalten.^{31,32} All diese Faktoren limitieren die Einsatzmöglichkeiten der 2D-Gewebemodelle *in vitro* und auch deren Übertragbarkeit auf die Situation *in vivo*.^{33,34} Um eine gewebespezifische Funktion zu modellieren ist eine genaue Nachbildung der gewebespezifischen Mikroumgebung nötig. Deshalb wurden bereits in den 50iger Jahren erste Zellen in einer 3D-Anordnung in Form sogenannter Organoiden kultiviert.³⁵ Bei den Organoiden, bzw. Sphäroiden, handelt es sich um kugelförmigen Zellaggregate, die sich aufgrund der Schwerkraft oder durch Kultivierung auf nicht-adhäsiven Oberflächen selbst ausbilden und durch die vielen Kontakte der Zellen untereinander zusammengehalten werden.³⁶⁻³⁸ Eine weitere Möglichkeit der 3D-Kultivierung ist die Einbettung von Zellen in Hydrogele, welche die Stützfunktion der ECM übernehmen.^{39,40} In Abbildung 1 sind die verschiedenen Zellkulturmodelle dargestellt.

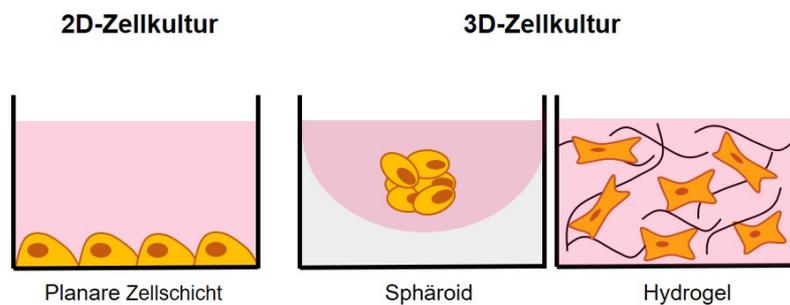


Abbildung 1: Verschiedene Kultivierungsmethoden von Zellen. Die planare Zellschicht ist eine 2D-Kultivierungsmethode. Die Kultivierung der Zellen in Form eines Sphäroids oder in einem Hydrogel eingebettet zählt zu den 3D-Kultivierungsmethoden.

Ein großer Nachteil dieser Methoden ist jedoch die fehlende Reproduzierbarkeit, da eine präzise Platzierung der Zellen mit diesen beiden 3D-Kultivierungsmethoden häufig nicht möglich ist.^{41,42} Die Zellen, Materialien und bioaktiven Moleküle werden in den herkömmlichen Kulturmethoden eher zufällig verteilt.⁴³ Um heutzutage die *in vivo* Situation noch exakter durch 3D-Gewebemodelle abzubilden, werden verschiedene Biofabrikationstechniken angewandt, bei denen Zellen, Materialien, Zellaggregate oder bioaktive Moleküle genau positioniert und assembliert werden können.⁴⁴ Dabei wird zwischen Techniken der Bioassemblierung und des Biodrucks unterschieden. Bei der Bioassemblierung werden hierarchische Strukturen mit einer definierten 3D-Anordnung durch eine automatische Assemblierung von Zell-enthaltenden Bausteinen gebildet. Dieser Prozess wird dabei durch die zellgesteuerte Selbstorganisation oder durch die Assemblierung von Zell- und Materialbausteinen mit Hilfe von mikrostrukturierter Formen oder mikrofluidischer Systeme initiiert.^{45,46} Durch Biodruckprozesse werden Zellen

und/oder Materialien durch Computer-unterstützte Transferprozesse präzise in einer 3D-Anordnung mit einer definierten Struktur positioniert um artifizielle Gewebemodelle zu konstruieren.^{47,48}

2.2 3D-Biodruckmethoden

Beim 3D-Biodruck werden Biomaterialien und Zellen gleichzeitig in einem schichtweisen Verfahren in einer definierten Anordnung positioniert, wodurch gezielt 3D-Strukturen und Gewebemodelle generiert werden können.^{42,49} Dieser Prozess kann dabei in drei Arbeitsschritte unterteilt werden: die Vorverarbeitung, die Verarbeitung (der eigentliche Druckprozess) und die Nachverarbeitung.⁵⁰ Zu Beginn muss die Struktur des Gewebemodells für den Biodruck mit Hilfe rechnerunterstützter Konstruktion (engl.: *computer-aided design models*, CAD) designt werden. Daten für diese Modelle können z.B. durch Computertomografien oder Magnetresonanztomografien des entsprechenden Gewebes generiert werden.⁵¹ Anschließend erfolgt der eigentliche 3D-Druckprozess mit einem Biodrucker. Das so generierte vorläufige Gewebekonstrukt wird dann häufig unter Zellkulturbedingungen kultiviert, sodass durch eine Remodellierung der Matrix und eine Zellproliferation oder Differenzierung das endgültige Gewebe ausgebildet werden kann.^{50,52} Obwohl es noch einige Jahrzehnte dauern wird bis voll funktionsfähige Gewebe oder Organe mit dieser Methode für die regenerative Medizin generiert werden können, kommen die gedruckten *in vitro* Gewebemodelle bereits für die Medikamentenentwicklung und Krankheitsmodellierung zum Einsatz.⁵³⁻⁵⁶ Bei den für unter anderem diese Anwendungsgebiete eingesetzten Biodruckprozessen wird dabei zwischen drei verschiedenen Techniken unterschieden: dem Laser-basierten, dem Inkjet-basierten und dem Extrusions-basierten Druckprozess. Für alle drei Techniken müssen die verwendeten Materialien bestimmte Voraussetzungen hinsichtlich ihrer rheologischen Eigenschaften erfüllen.

Bei der Laser-basierten Methode leitet ein Laserimpuls einzelne Zellen von einem Donor- auf ein Akzeptorsubstrat. Das Donorsubstrat wird zunächst mit einer Zell-Matrix-Suspension beschichtet. Der fokussierte Laserimpuls erzeugt dann Luftblasen in der Zellsuspension wodurch einzelne Zellen freigesetzt und auf ein Akzeptorsubstrat aufgebracht werden.⁴² Diese Methode wird deshalb auch als Laserinduzierter-Vorwärtstransfer (engl.: *laser induced forward transfer*, LIFT) bezeichnet. Der Vorgang ist in Abbildung 2 dargestellt. Da keine Druckernadel für den Prozess nötig ist können auch hochviskose Materialien für den Druckprozess eingesetzt werden. Zusätzlich erlaubt das LIFT-Verfahren eine präzise Positionierung von Materialien und Zellen in kleinen 3D-Strukturen, ohne dass die Viabilität der Zellen dabei negativ beeinflusst wird.^{57,58} Durch Einsatz dieser Methode konnten Zellen bereits in einer Auflösung im Mikrometerbereich präzise platziert werden.⁵⁹ Diese Präzision führt jedoch zu einer starken Verlangsamung des Druckprozesses, sodass die Generierung von größeren und damit klinisch relevanteren Strukturen sehr zeitaufwändig ist und dadurch keine breite Anwendung findet. Beim Inkjet-basierten Biodruck werden Zellen zusammen mit der Stützmatrix durch Dispersion in Form von Tropfen durch eine schmale Öffnung der Druckerkartusche kontaktlos auf ein Substrat aufgebracht.⁶⁰ Ein in die Kartusche integrierter piezoelektrischer Kristall beginnt dabei

nach Anlegen einer elektrischen Spannung zu vibrieren und forciert dadurch die Bildung von Flüssigkeitstropfen an der Kartuschenöffnung.⁶¹ Dies ist in Abbildung 2 dargestellt. Der Einsatz dieser Methode erlaubt die präzise Positionierung von Zellen und sehr kleinen Volumina (1-100 Pikoliter).^{62,63} Daher wird dieses Verfahren sowohl für die Positionierung von Zellen in einer 2D-Anordnung als auch in einer 3D-Anordnung verwendet. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die eingesetzten Materialien nur eine sehr geringe Viskosität aufweisen dürfen. Diese sollte für einen erfolgreichen Druckprozess im Bereich von 0,1 Pa·s liegen.⁶⁴ Der Einsatz von viskosen Stoffen wie Hydrogelen oder Komponenten der ECM ist daher bei dieser Druckmethode deutlich erschwert.⁶⁵ In Kombination mit den geringen Dosiervolumina ist eine Anwendung dieser Biodruckmethode zum Aufbau größerer und damit klinisch relevanter Gewebemodelle eine große Herausforderung.⁴³

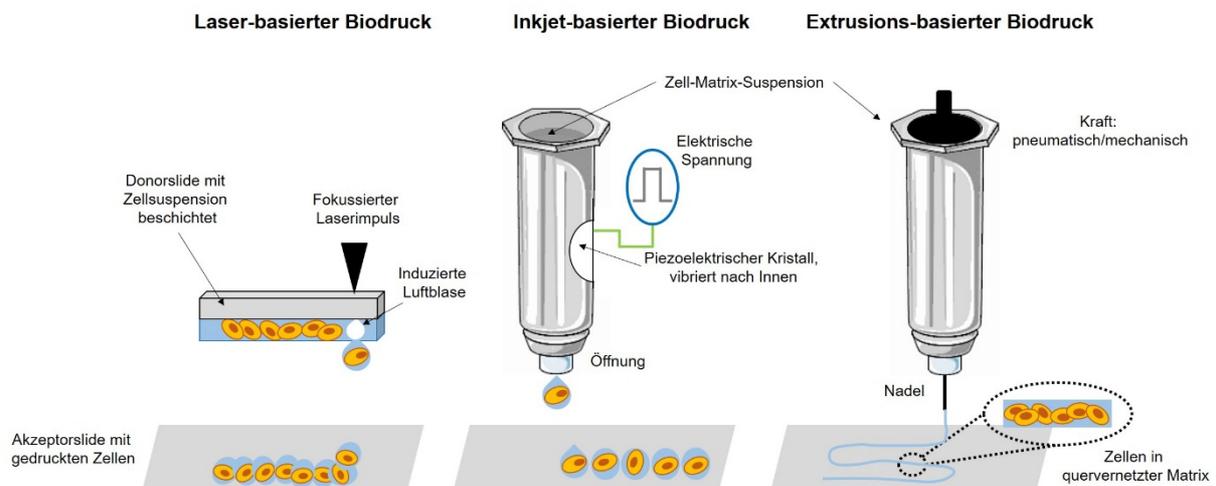


Abbildung 2: Darstellung der verschiedenen 3D-Biodruckmethoden: Laser-basierter Biodruck, Inkjet-basierter Biodruck, Extrusions-basierter Biodruck (modifiziert nach Dababneh et al., 2014).⁴²

Beim Extrusions-basierten Druckprozess werden Zellen zusammen mit einer Stützmatrix auf einem Substrat positioniert. Dabei erfolgt die Dispersion der Lösung pneumatisch oder mechanisch durch Spritzenpumpen. Im Gegensatz zu einzelnen Tropfen werden bei dieser Methode lange Fasern generiert die von dem Drucker kontinuierlich auf dem Substrat abgelegt werden. Dies ist in Abbildung 2 dargestellt. Damit die gedruckten Strukturen eine ausreichende Formstabilität aufweisen, werden für diese Druckmethode viskose Materialien eingesetzt, die ein vorzeitiges Auseinanderfließen der Fasern verhindern.⁶⁶ Die Auflösung bei dieser Methode ist mit ca. 200 µm deutlich geringer als die des Laser-basierten oder des Inkjet-basierten Biodrucks, dafür ist die Fabrikationsgeschwindigkeit der 3D-Strukturen deutlich höher.⁴³ Die Kontrolle des Materialflusses ist dabei bei der mechanischen Extrusion im Gegensatz zur pneumatischen Extrusion höher, da es bei der pneumatischen Extrusion häufig zu einer Verzögerung des Materialflusses aufgrund der langsamen Luftkompression kommt. Ein Nachteil des Extrusions-basierten Druckprozess stellt die erhöhte Scherspannung in den Druckernadeln dar. Diese kann sich negativ auf die Viabilität der Zellen auswirken. Es konnten allerdings

bereits erfolgreich Zellen mit einer hohen Viabilität durch dieses Verfahren positioniert werden.⁶⁷⁻⁶⁹ Diese Methode stellt somit die vielversprechendste zur Generierung von großen und damit klinisch relevanten Strukturen in relativ kurzer Zeit dar.⁷⁰⁻⁷²

2.3 Biotinten

Für einen erfolgreichen Aufbau von Gewebemodellen durch 3D-Biodruckprozesse ist die Wahl und Entwicklung geeigneter Biomaterialien von entscheidender Bedeutung. Die Zellen werden dabei für die meisten Drucktechniken zunächst mit den Materialien vermischt, wodurch eine sogenannte Biotinte entsteht. Diese wird dann in definierte Strukturen gedruckt um ein artifizielles Gewebe zu generieren. Die Tinten müssen deshalb zum einen die biologischen Anforderungen der Zellen und zum anderen die physikalischen und mechanischen Anforderungen des 3D-Druckprozesses erfüllen.⁷³ Die Wahl der Biotinte hängt von der spezifischen Anwendung, den verwendeten Zelltypen und der Art des Druckprozesses ab.⁷⁴

2.3.1 Anforderungen

Eine ideale Biotinte sollte, je nach Anwendung, die geeigneten physikalisch-chemischen Eigenschaften wie z.B. mechanische, rheologische, chemische und biologischen Eigenschaften aufweisen.⁷⁵ Durch den Einsatz dieser Tinte sollten dann Gewebestrukturen generiert werden, deren Festigkeit und Robustheit durch ein entsprechendes Polymernetzwerk dem Gewebe *in vivo* entspricht. Bei Knochen- und Knorpelgewebe sollte das verwendete Material deutlich fester sein, als für die Bildung von weichem Gewebe, vorkommend unter anderem in Leber oder Niere.^{76,77} Es konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Zelltypen über mechanosensitive Eigenschaften verfügen und die Festigkeit der umgebenden Matrix detektieren.⁷⁸ Je nach Härte des Materials weisen z.B. Epithelzellen, Fibroblasten, Muskelzellen oder Neuronen Unterschiede in der Morphologie und den Adhäsionseigenschaften auf.^{79,80} Weitere wichtige Eigenschaften für einen erfolgreichen Biodruckprozess sind die Viskosität der Biotinte und die Gelierungseigenschaften.⁴³ Die Viskosität des Materials beeinflusst die Formstabilität des gedruckten Konstrukts und bestimmt den Scherstress, der während des Prozesses auf die Zellen in der Biotinte wirkt. Die Gelierung oder Vernetzung des Materials nach dem Druckprozess sorgt für eine Fixierung der generierten Struktur. Je nach Vernetzungsmethode kann sich dies ebenfalls auf die Zellviabilität auswirken. Daher sollten diese unter möglichst physiologischen Bedingungen ablaufen.⁸¹ Für eine erfolgreiche Kultivierung von Zellen sollten die verwendeten Materialien biokompatibel und bioabbaubar sein, um die natürliche Mikroumgebung des Gewebes nachzubilden.⁸² Eine Ausrichtung der eingekapselten Zellen sowie eine Proliferation und Differenzierung sollte durch das Material ermöglicht werden. Die eingekapselten Zellen sollten sich in den Strukturen ausrichten, proliferieren und gegebenenfalls differenzieren können. Die Materialien sollten deshalb über bioaktive Domänen, wie Adhäsionsdomänen, verfügen, um eine Interaktion mit den Zellen zu gewährleisten.⁸³ Zusätzlich sollten sie enzymatisch abbaubar sein, damit die Zellen die Mikroumgebung remodellieren können und so die Möglichkeit einer späteren Vaskularisierung und einer neuen Gewebebildung gegeben ist.⁸⁴⁻⁸⁶ Die

Versorgung der eingekapselten Zellen mit Nährstoffen, Gasen und Signalmolekülen sollte z.B. durch eine poröse Materialstruktur sichergestellt werden.⁸⁷ Weitere Anforderungen an die Biotinten sind die Möglichkeit der chemischen Modifizierung um gewebespezifische Bedürfnisse zu erfüllen und die Produktion der Materialien in großen Mengen mit geringen Variationen zwischen einzelnen Chargen.^{88,89} In Abbildung 3 sind die einzelnen Parameter und ihre Beziehung untereinander für die erfolgreiche Bildung eines artifiziellen Gewebes zusammenfassend dargestellt. Die gewählte Biotinte bestimmt direkt die Viskosität, den Gelierungsmechanismus und die mechanischen Eigenschaften des Konstrukts. Zusätzlich bestimmen Prozessparameter des 3D-Biodrucks wie die Wahl der Druckernadel und die Fabrikationszeit den Druck der Gewebestruktur sowie die Viabilität und Funktion der eingebetteten Zellen.

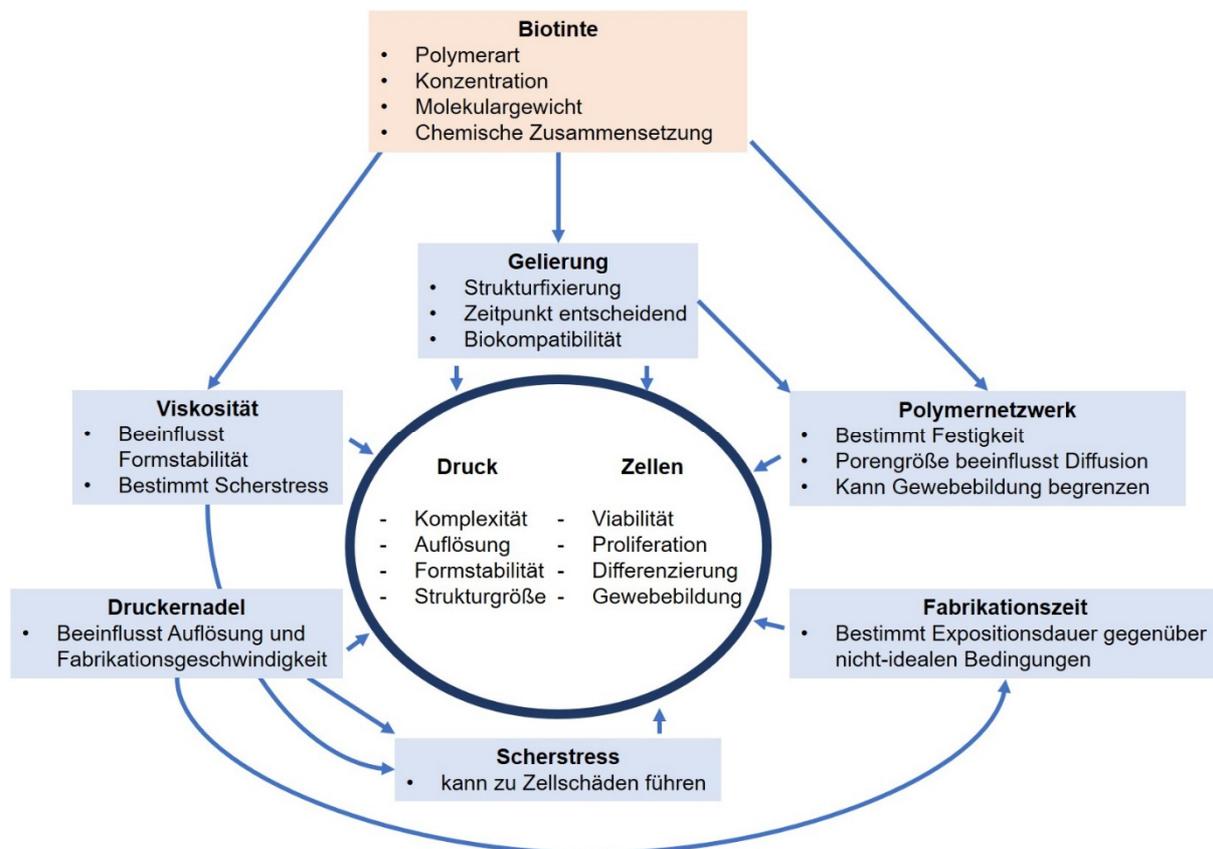


Abbildung 3: Wichtige Parameter für die Generierung eines artifiziellen Gewebes mit 3D-Biodruckprozessen. Die gewählte Biotinte (Polymerart, Konzentration, Molekulargewicht und chemische Zusammensetzung) bestimmt direkt die Viskosität, den Gelierungsmechanismus und die mechanischen Eigenschaften des Konstrukts. Diese Parameter in Kombination mit Prozessparametern wie der Wahl der Druckernadel und der Fabrikationszeit beeinflussen den Druck der Struktur sowie Viabilität und Funktion der Zellen. Modifiziert nach Malda et al.⁴³

Der wichtigste Schritt zur erfolgreichen Generierung eines Gewebemodells durch 3D-Biodruckprozesse ist somit die Wahl einer geeigneten Biotinte. Viele verschiedene natürliche und

synthetische Materialien wurden für diesen Prozess bereits genutzt.^{90,91} Als besonders vielversprechende Materialien gelten Hydrogele, da sie viele Eigenschaften der natürlichen ECM besitzen und die Einkapselung der Zellen in einer hoch-hydratisierten und mechanisch stabilen 3D-Mikroumgebung gewährleisten.^{92,93} Zusätzlich können Hydrogele beim 3D-Biodruck oft unter zellfreundlichen Bedingungen prozessiert werden, weshalb sie bevorzugt als Biotinten eingesetzt werden.

2.3.2 Hydrogele

Bei Hydrogelen handelt es sich um eine Klasse von vernetzten Polymeren, die in der Lage sind große Mengen an Wasser aufzunehmen und zu speichern.⁹⁰ Sie können dabei das 1000-fache ihres eigenen Gewichts an Wasser speichern, ohne sich dabei aufzulösen.³⁹ Die starke Hydrophilie dieser Materialklasse ist der Hauptgrund für ihre Biokompatibilität und macht Hydrogele dadurch zu geeigneten Kandidaten für die Generierung von Gewebemodellen. Die Polymerstruktur der Hydrogele ermöglicht dabei die Wassereinlagerung zwischen den einzelnen Polymerketten, wodurch letztlich das hydratisierte Gel entsteht.^{94,95} Im Bereich des *Tissue Engineering* und der regenerativen Medizin werden sie für eine Vielzahl von Anwendungsbereichen wie dem Wirkstofftransport, der Herstellung von Kontaktlinsen oder der Bildung von Wundauflagen eingesetzt.⁹⁶⁻⁹⁸ Da sie viele Eigenschaften der nativen ECM besitzen und ein hohes Maß an Biokompatibilität aufweisen, werden sie häufig für die Generierung von artifiziellem Gewebe eingesetzt. Die Zellen werden dabei in einer hoch-hydratisierten und mechanisch stabilen Hydrogelumgebung eingekapselt, die der Situation *in vivo* ähnelt. Zusätzlich stellen sie durch ihre Permeabilität für Sauerstoff, Nährstoffe und wasserlösliche Moleküle die Versorgung der Zellen sicher.^{99,100} Im Gegensatz zu polymeren Gerüststrukturen, welche ebenfalls im *Tissue Engineering* eingesetzt werden, bei denen die Zellen aber lediglich auf die Oberfläche der Strukturen aufgebracht werden, bieten Hydrogele eine flexible und poröse 3D-Mikroumgebung für die eingebetteten Zellen, was eine Zellkommunikation und Migration in alle Richtungen erlaubt.¹⁰¹⁻¹⁰³ Hydrogele für den Einsatz im *Tissue Engineering* können je nach Ursprung in zwei verschiedene Klassen unterteilt werden: die natürlichen Hydrogele wie Kollagen, Fibrin, Chitosan oder Alginat und die synthetischen Hydrogele wie Pluronic®, Polyethylenglykol (PEG) oder Milchsäure (engl.: *polylactic acid*, PLA), deren Strukturformeln in Abbildung 4 dargestellt sind.¹⁰⁴

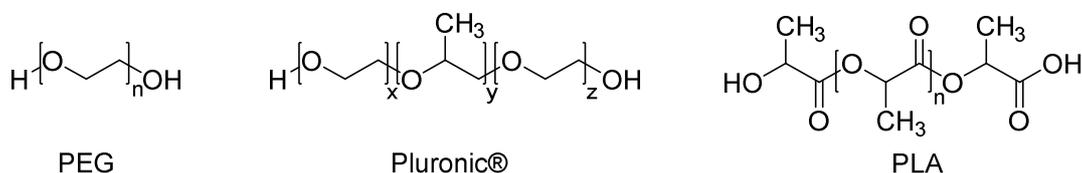


Abbildung 4: Strukturformeln der synthetischen Hydrogelpolymere PEG, Pluronic® und PLA.

Die natürlichen Hydrogele zeichnen sich durch ihre Biokompatibilität und ihre Bioabbaubarkeit aus. Einige von ihnen besitzen zusätzlich bioaktive Komponenten für eine Zelladhäsion und

Migration.⁹⁰ Die mechanische Stabilität der natürlichen Hydrogele ist oftmals jedoch sehr gering. Aufgrund ihres natürlichen Ursprungs kann sich zudem die genaue Zusammensetzung der Biopolymere von Charge zu Charge häufig ändern. Synthetische Hydrogele sind dagegen deutlich stabiler und in ihrer chemischen Struktur genau definiert, sie weisen jedoch keine bioaktiven Komponenten für die Interaktion mit den eingekapselten Zellen auf und ihre Abbauprodukte können toxische Effekte ausüben.⁹⁹ Natürliche, aus Vertebraten gewonnene Hydrogele wie Kollagen, Gelatine oder Fibrin weisen inhärente Signalmoleküle wie Zelladhäsionsdomänen natürlich auf.¹⁰⁵ Die Zellen können dadurch mit der Umgebungsmatrix interagieren und adhären. Dadurch kommt es zu einer Ausrichtung der Zellen innerhalb des Hydrogels, wodurch sich die Morphologie der Zellen ändert. Hydrogele wie Alginat oder Agarose, die aus anderen Organismen wie Algen oder Seegrass gewonnen werden, weisen diese Signalmoleküle, ähnlich wie die synthetischen Hydrogele, nicht auf.^{105,106} Somit dienen diese lediglich als 3D-Stützstruktur und üben keine biologisch aktive Funktion aus. In Abbildung 5 ist dies schematisch dargestellt. In einem Hydrogel ohne Adhäsionsdomänen weisen die eingebetteten Zellen eine runde Morphologie auf. Sind die Zellen in Hydrogele eingebettet, welche Adhäsionsdomänen besitzen, kommt es zu einer Elongation und Ausrichtung der Zellen innerhalb des Gels.

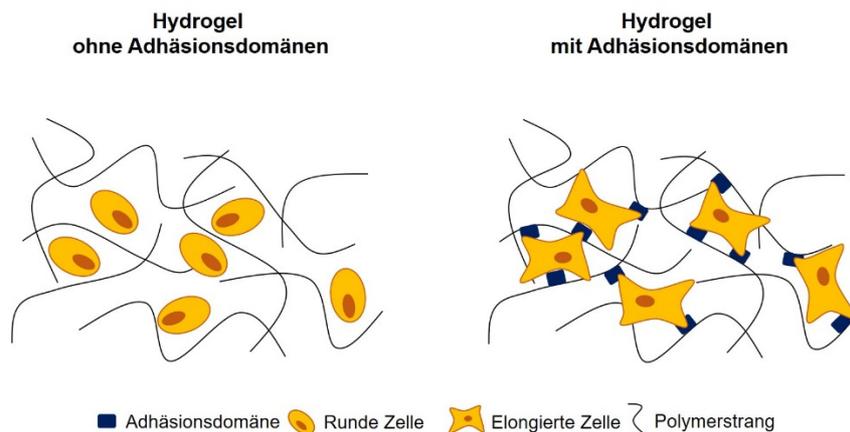


Abbildung 5: Morphologie von eingebetteten Zellen in Hydrogelen ohne Adhäsionsdomänen und mit Adhäsionsdomänen. Sind keine Adhäsionsdomänen vorhanden weisen die Zellen eine runde Morphologie auf. In Hydrogelen mit Adhäsionsdomänen kommt es zu einer Elongation und Ausrichtung der Zellen.

Um den Zellen trotzdem eine Adhäsion in synthetischen Hydrogelen zu ermöglichen müssen diese mit zellaktiven Komponenten modifiziert werden. Dafür werden häufig Tripeptide mit der Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) eingesetzt.^{107,108} Diese RGD-Domäne ist eine natürliche Zelladhäsionsdomäne und kommt hauptsächlich in Kollagen und Gelatine vor.¹⁰⁹ Zellen können diese Domäne durch Integrinrezeptoren erkennen und an sie binden. Aus diesen Gründen wurde der Einsatz sogenannter semi-synthetischer Hydrogele in den letzten Jahren immer verbreiteter.^{110,111} Sie vereinen die Eigenschaften der natürlichen und

synthetischen Polymere und zeichnen sich entsprechend durch eine hohe mechanische Stabilität und Reproduzierbarkeit bei der Herstellung, bei gleichzeitiger Biokompatibilität und natürlich vorhandenen bioaktiven Komponenten, aus. Zu semi-synthetischen Hydrogelen zählt auch das sehr häufig verwendete Gelatinemethacrylamid (GelMA)-Hydrogel. Dieses wurde bereits im Jahr 2000 von Van den Bulcke *et al.* synthetisiert, um die Nachteile von ausschließlich aus Gelatine bestehenden Hydrogelen zu adressieren.¹¹² Bei diesem semi-synthetischen Polymer sind die freien Aminogruppen der Lysinseitenketten der Gelatine mit Methacrylsäure modifiziert, wodurch Domänen für eine chemische Vernetzung einzelner Gelatinestränge geschaffen werden.¹¹³ Dadurch kann, im Gegensatz zur Vernetzung von natürlicher Gelatine, ein temperaturstabiles Hydrogel gebildet werden, welches sich bei Zellkulturbedingungen von 37 °C nicht auflöst und zusätzlich bioaktive Komponenten, wie die RGD-Domäne besitzt.¹¹⁴ Beim Einsatz der verschiedenen Hydrogele als Biotinten für 3D-Druckprozesse, werden die Zellen zunächst in den Polymerlösungen resuspendiert und anschließend in eine definierte 3D-Struktur gedruckt, die dann durch eine Gelierung oder Vernetzungsreaktion der einzelnen Polymerstränge stabilisiert wird.⁴³

2.3.2.1 Vernetzungsmethoden

Die Gelierung bzw. Vernetzung von gedruckten Hydrogelstrukturen ist für die Formstabilität der Strukturen und damit für den erfolgreichen 3D-Druckprozess von essentieller Bedeutung. Dabei wird zwischen physikalischen und chemischen Vernetzungsprozessen unterschieden. Die physikalischen Prozesse basieren dabei auf nicht-chemischen Interaktionen wie der Kettenverstrickung von einzelnen Polymerketten, Wasserstoffbrückenbildung, ionischen Wechselwirkungen oder hydrophoben Interaktionen.^{115,116} Diese reversiblen physikalischen Interaktionen zwischen den einzelnen Polymerketten stabilisieren dann die gebildeten Gele. Die physikalischen Vernetzungsmethoden finden bei 3D-Druckprozessen vor allem aufgrund ihrer Kompatibilität mit Zellen oder kleinen bioaktiven Molekülen wie Wachstumsfaktoren Anwendung, da auf den Einsatz von potentiell schädlichen Chemikalien und Quervernetzern (engl.: *crosslinker*) verzichtet werden kann.⁴³ Ein häufig als Biotinte eingesetztes Biopolymer ist Alginate, welches durch ionische Wechselwirkungen mit zweiwertigen Calciumionen vernetzt wird. Die aus Zuckermolekülen bestehenden Polymerketten lagern sich dabei mit ihren Carboxylgruppen an die Calciumionen an und bilden zusammenhängende, geordnete Strukturen, wodurch es zu einer Gelierung des Alginats kommt.¹¹⁷ Dieser Prozess ist in Abbildung 6 dargestellt. Diese nicht-kovalente Bindung ist jedoch schwach und kann z.B. durch andere zweiwertige Ionen, die ebenfalls in der Mikroumgebung von Zellen vorhanden sind, aufgelöst werden.¹⁰⁶

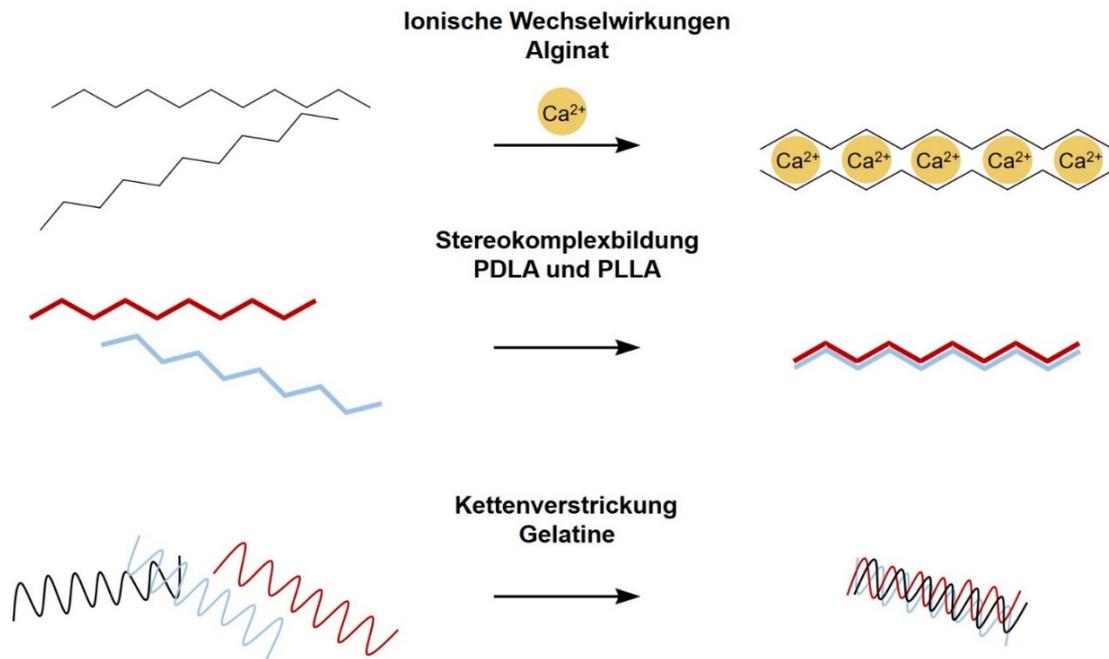


Abbildung 6: Darstellung der physikalischen Vernetzungsprozesse. Bei Alginat findet die Vernetzung der Zuckerketten durch ionische Wechselwirkungen mit Calciumionen statt. Bei der Stereokomplexbildung lagern sich die beiden Milchsäuren PDLA und PLLA aufgrund gegensätzlicher Chiralität zusammen. Bei der Kettenverstrickung von Gelatine lagern sich die einzelnen Kollagenhelices zu stabilen Tripelhelices zusammen. Modifiziert nach Bruchet et al., Biela et al., und Campiglio et al.¹¹⁸⁻¹²⁰

Eine weiterer physikalischer Vernetzungsprozess ist die Bildung von Stereokomplexen, wie z.B. zwischen den Polymilchsäuren D-Milchsäure (PDLA) und L-Milchsäure (PLLA). Durch die gegensätzliche Chiralität der beiden Polymere können sie sich zu Stereokomplexen zusammenlagern.^{121,122} Dieser Vorgang ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt. Durch Bindung der Polymilchsäuren an wasserlösliche Polymere wie Dextran oder PEG können durch die Komplexbildung feste Hydrogele entstehen.¹²³⁻¹²⁵ Da die Bildung dieser Stereokomplexe ein länger andauernder Prozess ist und nicht unmittelbar nach der Mischung der beiden Polymilchsäuren auftritt, bleibt die Lösung über einen längeren Zeitraum flüssig, wodurch sich die darauf basierenden Hydrogelbausteine auch als injizierbare Systeme zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung einsetzen lassen.^{126,127} Ein weiteres Beispiel eines Polymers dessen Vernetzung physikalisch, ohne den Einsatz von zusätzlichen Chemikalien oder vernetzenden Molekülen, sogenannten Crosslinkern, abläuft, ist Gelatine. Deren Vernetzungsprozess findet durch eine Verstrickung einzelner Polymerketten statt. Die einzelnen Kollagenhelices der Gelatine lagern sich bei Temperaturen unter 24 °C zu stabilen Tripelhelices zusammen und sorgen so für die Bildung eines festen Hydrogels (siehe Abbildung 6).^{128,129} Dieser Prozess ist jedoch reversibel, da es bei Temperaturen oberhalb von 24 °C zu einer Auflösung der stabilen Tripelhelices kommt und sich das Gel wieder verflüssigt.¹³⁰ Durch diese starke Temperaturabhängigkeit des Vernetzungsprozesses können Gelatinegele nicht für die Kultivierung von Zellen bei 37 °C eingesetzt werden. Neben dem Einfluss äußerer Faktoren sind ein weiterer

Nachteil physikalischer Vernetzungsmethoden die oft schwachen Bindungen der miteinander vernetzten Polymerketten und damit die geringen mechanischen Eigenschaften der gebildeten Hydrogele.^{131,132} Aus diesen Gründen werden für heutige 3D-Druckprozesse viele Hydrogele eingesetzt, die durch schwache physikalische Wechselwirkungen zunächst eine gute Druckbarkeit des Gels gewährleisten, anschließend aber durch eine chemische Vernetzung zusätzlich stabilisiert werden können.⁴³ Bei chemischen Vernetzungsprozessen werden neue kovalente Bindungen zwischen den Polymeren gebildet, was zur Ausbildung stabiler Hydrogelstrukturen führt. Zu den chemischen Vernetzungsmechanismen zählen Kondensationsreaktionen, Vernetzungen durch die Bildung von Schiffsbasen oder lichtinduzierte Vernetzungen.^{90,133,134} Schiffsbasen werden durch die nukleophile Addition von Aminen an Carbonylgruppen gebildet. Dabei können verschiedene Aminosäuren, Polysaccharide oder synthetische Polymere, die eine Aminogruppe aufweisen, unter milden Reaktionsbedingungen mit Aldehyd-Crosslinkern umgesetzt werden, wodurch ein kovalent vernetztes Hydrogel entsteht.¹³⁵ Der Grad der Vernetzung hängt dabei von der Konzentration des eingesetzten Crosslinkers ab. Ein hoher Vernetzungsgrad resultiert in einem Hydrogel mit hoher mechanischer Festigkeit, der Abbau des Hydrogels kann sich durch die erhöhte Anzahl zu spaltender Bindungen jedoch verzögern. Aufgrund der stärkeren Einkapselung zwischen den chemisch vernetzten Polymerketten kann die Freisetzung von immobilisierten, biologisch aktiven Molekülen wie Wachstumsfaktoren oder Wirkstoffen in der Hydrogelmatrix verzögert werden.^{90,136,137} Ebenso kann die Zellmigration und Ausbreitung durch den Vernetzungsgrad beeinflusst werden.¹³⁸

Bei der oft genutzten Photopolymerisation werden einzelne Polymerketten durch Bestrahlung mit Licht zu einem festen Hydrogel vernetzt.¹³⁹ Der Vernetzungsprozess wird dabei in Gegenwart eines Photoinitiators initiiert. Dieser zerfällt nach der Bestrahlung in freie Radikale, die einen radikalischen Vernetzungsprozess zwischen den einzelnen Polymerketten starten, was zur Bildung eines chemisch verknüpften Polymernetzwerks führt.¹⁴⁰ Da vor allem Polymere, die zur Bildung natürlicher Hydrogele genutzt werden die für diese Reaktion benötigten funktionellen Gruppen nicht aufweisen, müssen diese Polymerketten zunächst mit funktionellen Gruppen, wie Vinylgruppen modifiziert werden, die durch die freie radikalische Polymerisation miteinander vernetzt werden können.¹⁴¹⁻¹⁴³ Der Vorteil der Photopolymerisation liegt dabei in der zeitlichen und räumlichen Kontrolle der Vernetzung, wodurch z.B. der Grad der Vernetzung und damit die mechanischen Eigenschaften des resultierenden Gels gezielt beeinflusst werden können.¹⁴⁴ Der Bestrahlungsprozess zur Initiierung der Vernetzungsreaktion kann sich jedoch negativ auf die einzukapselnden Zellen auswirken, da sich diese zum Zeitpunkt der Vernetzung bereits in der Reaktionslösung befinden.^{145,146}

2.3.2.2 Rheologische Eigenschaften

Ein weiterer wichtiger physikalisch-chemischer Parameter für den erfolgreichen Aufbau von Gewebemodellen mit 3D-Biodruckprozessen sind neben der Vernetzungsmethode auch die rheologischen Eigenschaften der Hydrogele. Die Rheologie beschreibt das Fließ- und Deformationsverhalten von Materialien bei einer externen Krafteinwirkung und ist deshalb für 3D-

Druckprozesse hoch-relevant.¹⁴⁷ Wichtige rheologische Eigenschaften, die sich auf die Druckbarkeit der Materialien auswirken sind dabei die Viskosität, die Fließgrenze und die Scherviskosität.^{43,148} Die Viskosität von Materialien wird dabei als Resistenz gegenüber des Fließverhaltens bei Krafteinwirkung definiert.¹⁴⁹ Beim Druckprozess verhindert eine hohe Viskosität der Biotinte die oberflächenspannungsinduzierte Tropfenbildung und das Kollabieren der gedruckten Strukturen.^{150,151} Die Viskosität der Biotinten wird dabei vor allem durch die Polymerkonzentration und das Molekulargewicht bestimmt. Da Hydrogele mit hohen Polymerkonzentrationen einen negativen Effekt auf Zellmigration, Proliferation und Gewebeformung aufgrund der hohen Polymerdichte ausüben können, wird der Einsatz von Polymeren mit einem hohen Molekulargewicht in geringen Konzentrationen immer populärer.¹⁵² Dies kann besonders durch den Einsatz natürlicher Hydrogele erreicht werden. Deren sehr hohes Molekulargewicht wird von synthetischen Polymeren oft nicht erreicht. Dadurch können natürliche Hydrogele in geringeren Konzentrationen bei gleichzeitig hoher Viskosität eingesetzt werden.^{153,154} Dies beeinflusst direkt positiv die Formstabilität der gedruckten Konstrukte nach dem Druckprozess. Die Druckbarkeit der Materialien nimmt dabei mit steigender Viskosität zu. Da die Viskosität bei Hydrogelen jedoch häufig begrenzt ist, werden aus diesem Grund beim Druck mit Hydrogelen häufig schlechtere Auflösungen und Genauigkeiten erzielt als beim Druck mit thermoplastischen Polymeren.⁴³ Ein Anstieg der Viskosität kann ebenfalls zu einem Anstieg des Scherstress für die eingekapselten Zellen während des Druckprozesses führen, was sich negativ auf die Viabilität der Zellen auswirken kann.¹⁵⁵ Vor allem bei Extrusions-basierten Druckprozessen mit hohen Flussraten und kleinen Nadelöffnungen konnten negative Einflüsse auf die Zellviabilität detektiert werden.¹⁵⁶ Weitere wichtige rheologische Eigenschaften die die Druckbarkeit der Materialien beeinflussen sind die Fließgrenze und die Scherviskosität.¹⁵⁷ Die Fließgrenze bezeichnet dabei die Kraft die aufgebracht werden muss, damit ein Fließen der Materialien initiiert wird.¹⁵⁸ Allgemeine Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Polymerketten resultieren in einem instabilen temporären physikalischen Netzwerk, was durch einwirkende Scherkräfte zerstört werden kann, sich aber wieder ausbildet, wenn die Krafteinwirkung erlischt.¹⁵⁹ Dieser Effekt hängt eng mit der Scherviskosität zusammen. Bei scherverdünnendem Verhalten von Materialien nimmt die Viskosität mit zunehmender Scherrate ab.¹⁶⁰ Beim Druckprozess kommt es durch die Scherkräfte während der Extrusion durch die Druckernadel zu einer Auflösung der instabilen physikalischen Interaktionen zwischen den Polymerketten untereinander.¹⁶¹ Die einzelnen Ketten bilden durch die Krafteinwirkung eine elongierte Form aus, wodurch die Viskosität verringert wird. Dieser Prozess ist in Abbildung 7 dargestellt.

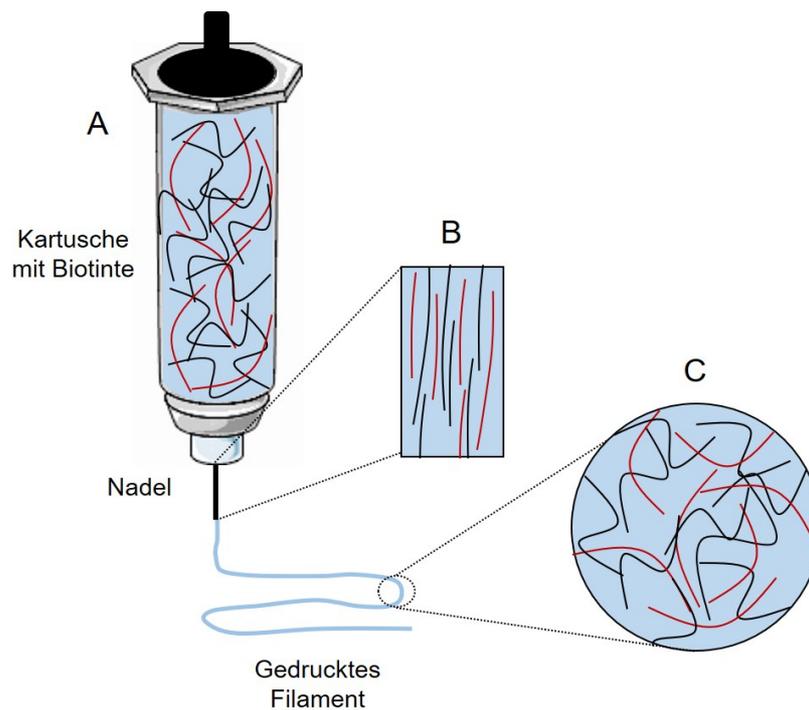


Abbildung 7: Darstellung der Scherviskosität und Fließgrenze beim Druckprozess von Hydrogelen. **A:** In der Kartusche bilden einzelne Polymerstränge durch physikalische Wechselwirkungen ein temporäres Netzwerk und erhöhen so die Viskosität der Lösung. **B:** Während der Dosierung durch die Druckernadel, wird das temporäre Netzwerk durch die Scherkräfte aufgebrochen und alle Polymerketten richten sich entlang der Krafteinwirkung aus, wodurch die Viskosität der Tinte erheblich herabgesetzt wird. **C:** Nach Wegnahme der Scherkräfte bildet sich das temporäre Netzwerk zwischen den Polymerketten umgehend wieder aus wodurch sich das gedruckte Filament verfestigt. Modifiziert nach Malda et al.⁴³

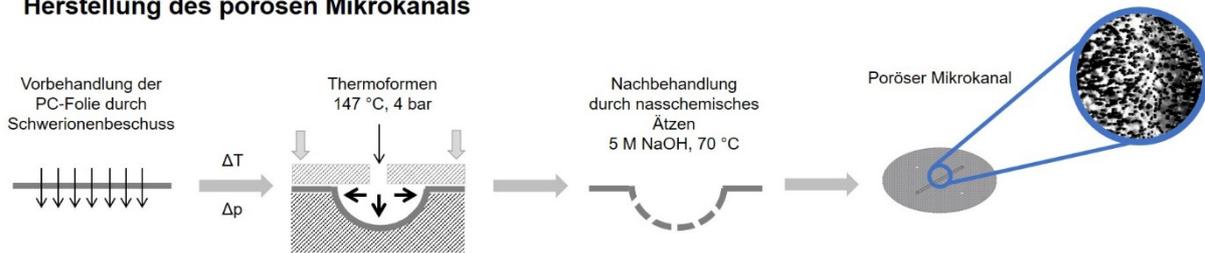
Nach Wegnahme der Scherkräfte bildet sich das temporäre Netzwerk zwischen den einzelnen Polymerketten umgehend wieder aus und das gedruckte Filament verfestigt sich. Dieser Effekt kann vor allem bei natürlichen Polymeren mit hohem Molekulargewicht, wie z.B. Alginate detektiert werden und ist für den Druckprozess zellbeladener Biotinten wichtig, da so der auf die Zellen wirkende Scherstress während dem Druckprozess durch die abnehmende Viskosität der Tinte verringert werden kann.^{153,162}

Neben den korrekt angeordneten 3D-Strukturen sind dynamische Prozesse im angestrebten Modell wie Kontraktion oder der Blutstrom und die daraus resultierenden Scherkräfte wichtig für die Gewebeentwicklung.¹⁶³ Eine Rekonstruktion dieser dynamischen Prozesse ist deshalb für den Aufbau von artifiziellem Gewebe essentiell. Aus diesem Grund wird die Vaskularisierung von artifiziellem Gewebemodellen häufig durch sogenannte *Organ-on-a-Chip*-Systeme nachgebildet.

2.4 Organ-on-a-Chip-Systeme

Organ-on-a-Chip-Systeme können die gewebespezifische Mikroumgebung in einer 3D-Anordnung, wie auch die Fluidodynamik des Gewebes durch Simulation eines Blutstroms nachbilden.^{164,165} Die Chip-Systeme sind dabei aus zwei Kompartimenten aufgebaut, die durch eine dünne, poröse Membran voneinander getrennt sind. Ein Kompartiment dient dabei der Geweberekonstruktion, das andere bildet ein artifizielles Blutgefäßsystem.¹⁶⁶ Durch Anschluss der Chips an mikrofluidische Pumpensysteme wird dann ein künstlicher Blutstrom erzeugt, der das umliegende Gewebekonstrukt mit Nährstoffen versorgt. Durch den Einsatz humaner Zellen konnten bereits Modelle der Lunge, der Leber oder des Herzes entwickelt werden.¹⁶⁷⁻¹⁷⁰ Aus diesem Grund gewinnen die *Organ-on-a-Chip*-Systeme auch in der Medikamentenentwicklung und in der regenerativen Medizin zunehmend an Bedeutung, da sie sich durch die zusätzliche Vaskularisierung der Gewebemodelle für Wirkstoffscreenings und Krankheitsmodellierungen eignen.^{171,172} Da Medikamente häufig über die Blutbahn verabreicht werden, ist die Nachbildung des Blutkreislaufs für das Screening potentieller Wirkstoffkandidaten von essentieller Bedeutung.^{173,174} Nur so können Informationen über die Bioverfügbarkeit und den transendothelialen Transport der Moleküle erhalten werden.^{175,176} Im Arbeitskreis von Prof. Dr. Ute Schepers am Institut für Funktionelle Grenzflächen am Karlsruher Institut für Technologie wurde ein solches Chip-System, der vasQchip, entwickelt. Dieser ist aus einem halbrunden porösen Mikrokanal aus Polycarbonat (PC) und einem darunterliegenden Kompartiment aufgebaut.¹⁷⁷ Durch eine Besiedlung des Kanals mit Endothelzellen und einem Anschluss an eine Mikrofluidik wird ein artifizielles Blutgefäß erzeugt. Das darunterliegende Kompartiment kann dann zur 3D-Kultivierung von gewebespezifischen Zellen eingesetzt werden, wodurch ein vaskularisiertes Gewebemodell generiert wird. Der vasQchip wird durch die *Substrate Modifikation and Replication After Thermoforming* (SMART) Methode hergestellt.¹⁷⁸ Dieser Prozess ist in Abbildung 8 dargestellt. Zunächst wird eine zuvor mit Schwerionen beschossene Polymerfolie durch Thermoformen zu einem Mikrokanal geformt. Durch einen anschließenden Ätzprozess werden aus den Ionenspuren in der Folie Poren gebildet, wodurch die Grundvoraussetzung für eine Sicherstellung der späteren Nährstoffversorgung des unteren Kompartiments erfüllt wird. Durch Laserschweißen wird die Polymerfolie mit dem Mikrokanal dann mit einem PC-Chip verbunden und mit einem Deckglas verschlossen. Die Herstellung der Chips erfolgt im Spritzgussverfahren. Nach der Assemblierung kann der vasQchip dann mit verschiedenen Zellen besiedelt und an mikrofluidische Pumpensysteme angeschlossen werden.

Herstellung des porösen Mikrokanals



Assemblierung des vasQchips und biologische Anwendung

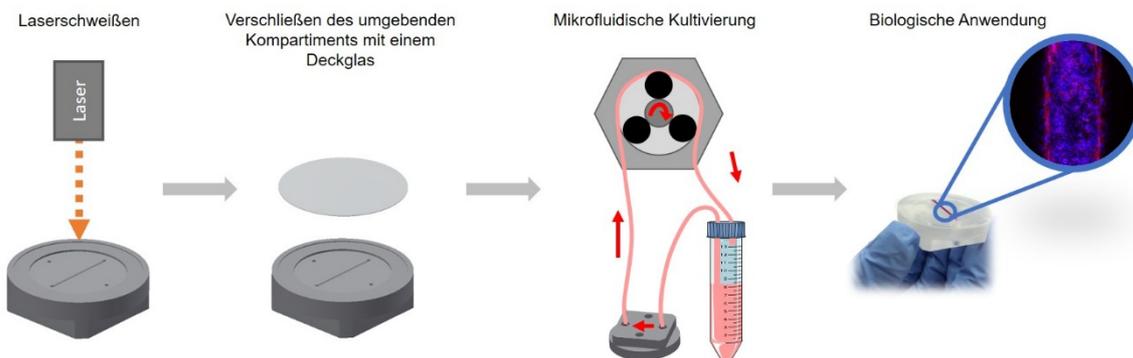


Abbildung 8: Herstellung des vasQchips. Die Polycarbonatfolie wird zunächst mit Schwerionen beschossen und anschließend durch Thermoformen zu einem runden Mikrokanal geformt. Durch den anschließenden Ätzprozess werden aus den Ionenspuren Poren in der Folie erzeugt. Durch Laserschweißen wird der Kanal dann auf dem Chip aufgebracht und mit einem Deckglas verschlossen. Anschließend kann der Chip mit verschiedenen Zellen besiedelt und an mikrofluidische Pumpensysteme angeschlossen werden. Modifiziert nach Grün et al.¹⁷⁸

Um komplexe artifizelle Gewebe mit einer geeigneten Mikrostruktur sowie Fluidynamik für mechanische und chemische Stimuli zu generieren, können die Technologien des 3D-Biodrucks und der *Organ-on-a-Chip*-Systeme miteinander kombiniert werden.^{179,180} Die Chip-Systeme ermöglichen die Vaskularisierung und Nachbildung des Blutstroms und durch Einsatz des 3D-Biodrucks können die gewebespezifischen Zellen gezielt in einer definierten 3D-Anordnung um die Blutgefäße positioniert werden.¹⁸¹

3 Zielsetzung

Zum Aufbau von komplexen vaskularisierten Gewebemodellen durch den gleichzeitigen Einsatz von *Organ-on-a-Chip*-Systemen und dem 3D-Biodruck ist die Wahl der geeigneten Biotinte essentiell. Diese muss zum einen die biologischen Anforderungen erfüllen, zum anderen muss sie geeignete physikalisch-chemische Eigenschaften aufweisen, damit durch den 3D-Druckprozess stabile, definierte Gewebestrukturen konstruiert werden können. Daher bestand das Ziel dieser Arbeit in der Synthese und Entwicklung neuer semi-synthetischer Hydrogele, welche als Biotinten für den 3D-Biodruck eingesetzt werden können (Abbildung 9). Als Grundlage der Synthese diente Gelatine und das bereits etablierte Hydrogel GelMA. Dabei lag der Fokus zunächst auf der umfassenden Charakterisierung der synthetisierten Gelatine-basierten Photopolymere sowie der Untersuchung der physiko-mechanischen Eigenschaften der daraus gebildeten Hydrogele. Die Eignung der Gelatine-basierten Hydrogele für die 3D-Zellkultur sollte anschließend anhand von Biokompatibilitätsuntersuchungen an verschiedenen Zelltypen evaluiert werden. Für den Einsatz der Gelatine-basierten Photopolymere als Biotinten für Extrusionsdruckprozesse sollte zunächst eine Optimierung der Druckparameter erfolgen. Daraufhin sollten die zellbeladenen Biotinten verdruckt und die Biokompatibilität des Druckprozesses evaluiert werden. Durch die Kombination aus den entwickelten Biotinten, des 3D-Biodrucks und der *Organ-on-a-Chip*-Technologie sollte abschließend ein 3D-Modell der Blut-Hirn-Schranke aufgebaut werden.

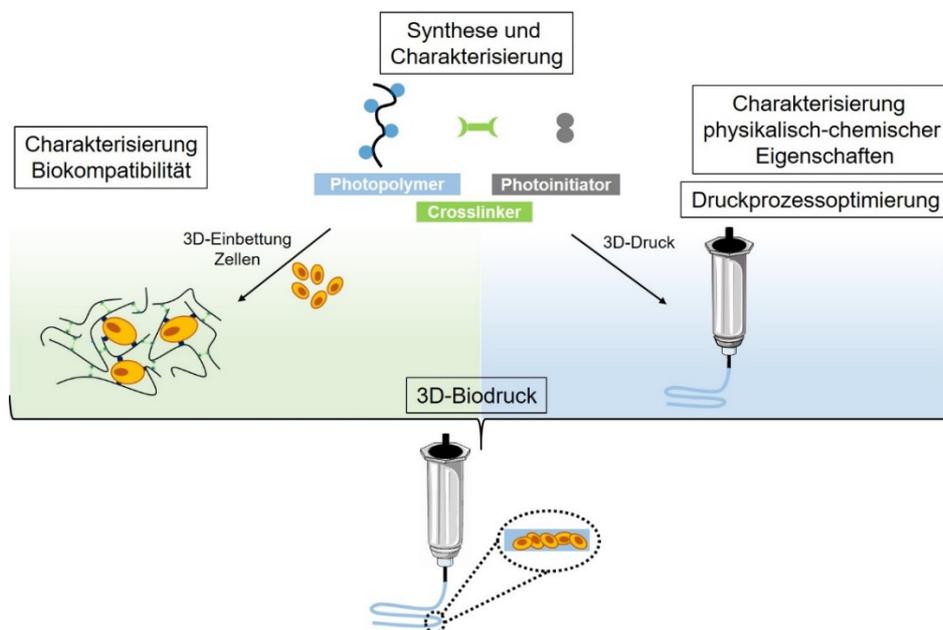


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Entwicklung von Hydrogelen, die als Biotinten für 3D-Druckprozesse eingesetzt werden können. Von besonderer Relevanz ist dabei die Evaluierung der Biokompatibilität der Hydrogele, ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften sowie der Druckparameter des Extrusionsdruckprozesses.

4 Ergebnisse

Der Aufbau von 3D-Gewebemodellen, die in ihrer Funktion und Struktur den Gegebenheiten *in vivo* ähneln, stellt eine große Herausforderung im Bereich des *Tissue Engineering* dar. Dabei liegt der Schlüssel zum Erfolg häufig in der Wahl einer geeigneten Stütz-/Umgebungs-matrix. Jede einzelne Zelle im menschlichen Körper ist von einer solchen extrazellulären Matrix umgeben. Diese verleiht den Zellen nicht nur mechanische Stabilität, sie übt auch einen erheblichen Einfluss auf die Gewebeentwicklung, Proliferation, Migration und nicht zuletzt auch auf die Zell- bzw. Gewebefunktion aus.¹⁸² Die Nachbildung dieser Eigenschaften erfordert ein stabiles und gleichzeitig bioabbaubares Material, welches ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit in der Herstellung besitzt, biokompatibel und permeabel für Nähr- und Signalfstoffe ist und über Zellinteraktionsdomänen verfügt.^{81,183} Eine weitere Herausforderung für den Aufbau von Gewebemodellen mit Hilfe des Biodrucks stellen die physikalischen Eigenschaften des Materials dar. So muss dieses für einen 3D-Druckprozess eine geeignete Stabilität, Form und Auflösung aufweisen.¹⁸⁴ Gleichzeitig sollte sich der Druckprozess nur minimal auf die Zellviabilität auswirken. Somit muss das gewählte Material zum einen die mechanischen Anforderungen eines Druckprozesses erfüllen, zum anderen die biologische Anforderung der Zellen bzw. des Gewebes.⁷⁰ Hydrogele erfüllen einige dieser Anforderungen und eignen sich dadurch für den Aufbau von 3D-Gewebemodellen durch Biodruckverfahren. Dies gilt insbesondere für Gelatine-basierte Hydrogele. Gelatine wird aus Kollagen gewonnen, welches ein natürlicher Baustein des Bindegewebes und somit der natürlichen ECM ist. Daher weist Gelatine die essentiellen Zellinteraktionsdomänen natürlich auf, ist bioabbaubar und biokompatibel.¹⁸⁵ Gelatine bildet bei Temperaturen unterhalb von 24 °C tertiäre Tripelhelices und damit eine feste Gelstruktur aus. Dies ist jedoch ein reversibler Prozess, der bei wärmeren Temperaturen zur Denaturierung der Tertiärstruktur führt.¹²⁸ Daher ist Gelatine als Reinstoff für eine Anwendung in der 3D-Zellkultur bei 37 °C nicht geeignet. Durch eine chemische Modifikation der Gelatineketten kann diese jedoch zu verschiedenen Photopolymeren funktionalisiert werden, die durch eine Photoreaktion ein kovalentes, vernetztes und temperaturstabiles Hydrogel ausbilden.⁹⁰

4.1 Synthese und Charakterisierung der Photopolymere

Um aus Gelatine ein temperaturstabiles Hydrogel zu generieren, wurde diese zunächst mit verschiedenen photoreaktiven Gruppen zu drei verschiedenen Photopolymeren funktionalisiert.

4.1.1 Gelatine

Bevor mit der Synthese der einzelnen Photopolymere begonnen wurde, wurde die verwendete Gelatine chemisch charakterisiert, um den Gehalt an freien Aminogruppen zu bestimmen, über welche die Funktionalisierung der Gelatine stattfinden sollte. Dies wurde in Kollaboration mit Tobias Göckler und Xenia Kempfer (AK Schepers, Institut für Funktionelle Grenzflächen, KIT)

durchgeführt.^{186,187} Bei der verwendeten Gelatine handelte es sich um Gelatine Typ A aus Schweinehaut, Bloom 300 (Sigma Aldrich). Gelatine wird aus Kollagen Typ I, welches sich hauptsächlich im Haut- und Knochengewebe befindet, gewonnen. Dabei wird zwischen der sauren (Gelatine Typ A) oder der basischen (Gelatine Typ B) Hydrolyse zur Gewinnung unterschieden.¹⁸⁸ Nach der Hydrolyse des tierischen Ausgangsmaterials wird das Kollagen extrahiert. Die bei diesem Vorgang verwendete Temperatur hat einen erheblichen Einfluss auf die Gelierkraft der Gelatine.¹⁸⁸ Je höher die Temperatur der Extraktion, desto niedriger ist die Kraft. Diese Eigenschaft wird anschließend über die sogenannte Bloom-Zahl bestimmt. Je größer diese ist, desto stärker ist die Gelierkraft der Gelatine. Typische Werte für Gelatine aus Schweinehaut liegen dabei zwischen 50 und 300 Bloom.¹⁸⁹ Die zur Funktionalisierung benötigten freien Aminogruppen der Gelatine befinden sich an den beiden Aminosäuren L-Lysin (Lys) und L-Hydroxylysin (Hyl). Diese stellen ca. 3-5 % der Aminosäuren in Gelatine dar.¹⁹⁰ Die häufigste Aminosäure ist jedoch Glycin (Gly). Diese bildet zusammen mit Prolin (Pro) und Hydroxyprolin (Hro) ein sich immer wiederholendes Gly-Pro-Hro-Motiv. Dieses befähigt das Aneinanderlagern von einzelnen Helices und somit die Bildung der reißfesten, tertiären Tripelhelices.¹⁹¹ Diese Helices lagern sich im Gewebe dann zu Mikrofibrillen zusammen und verleihen so dem Gewebe seine Stabilität.¹⁹²

Um die durchschnittliche Stoffmenge der freien Aminogruppen in der verwendeten Gelatine zu bestimmen, wurde der Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBSA)-Assay durchgeführt. Bei dieser kolorimetrischen Nachweismethode reagieren die ϵ -Aminogruppen, wie sie z.B. in den Seitenketten von Lys oder Hys vorkommen, mit dem TNBSA zu einem gelben Trinitrobenzyllderivat, dessen Absorption bei 335 nm bestimmt werden kann. Dieser Vorgang ist in Abbildung 10 dargestellt.

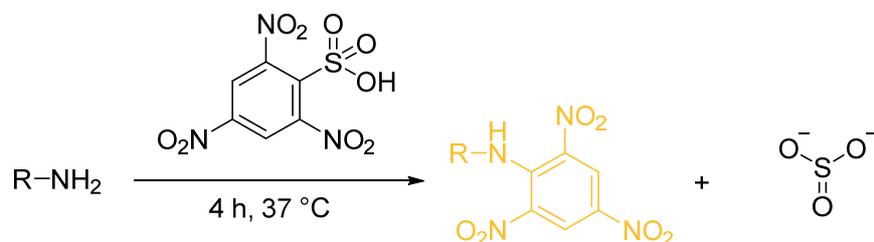


Abbildung 10: Reaktion des TNBSA mit primären Aminogruppen zu dem gelben Trinitrobenzolsulfonsäurederivat. Modifiziert nach ThermoFisher.¹⁹³

Dafür wurde zunächst eine Standardkurve aus einer Verdünnungsreihe mit Glycinlösungen verschiedener Konzentrationen (2-12 µg/ml) erstellt. Diese ist in Abbildung 11 dargestellt. Es zeigte sich ein lineares Verhalten, bei dem die Zunahme der Absorption mit der Zunahme an freien Aminogruppen korrelierte.

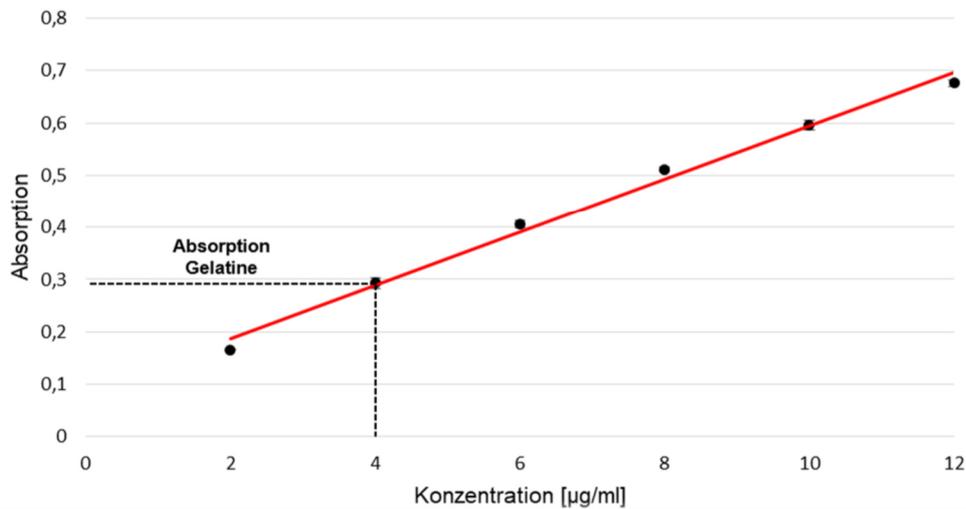


Abbildung 11: Glycin-Standardkurve zur Bestimmung der Stoffmenge an freien ϵ -Aminogruppen in 1 g Gelatine. Mit den für Gelatine bestimmten Absorptionswerten wurde eine durchschnittliche Stoffmenge von 0,266 mmol NH_2 -Gruppen pro g Gelatine berechnet. Erstellt in Kollaboration mit T. Göckler und X. Kempter.^{186,187}

Durch die Bestimmung der Absorptionswerte der verwendeten Gelatine (Typ A, Schweinehaut, Bloom 300) konnte mit Hilfe der Standardkurve die durchschnittliche Menge freier Aminogruppen der Lys- und Hys-Seitenketten ermittelt werden. Diese betrug $0,266 \pm 0,04$ mmol/g Gelatine und deckte sich mit dem Wert in der Literatur ($0,286$ mmol/g).¹⁹⁴

4.1.2 GelMA-V1

Da sich Gelatine in reiner Form nicht für den Einsatz in der 3D-Zellkultur eignet, wurde die Gelatine an den enthaltenen Lysinseitenketten mit Methacrylsäureanhydrid (MAA) zu dem semi-synthetischen Polymer Gelatinemethacrylamid (GelMA) funktionalisiert, um eine chemische Vernetzung der einzelnen Ketten zu ermöglichen. GelMA ist schon seit mehreren Jahren für die Anwendung in der 3D-Zellkultur etabliert, da es die Eigenschaften natürlicher und synthetischer Hydrogele vereint und so ein breites Anwendungsgebiet gewährleistet.¹⁹¹ Zum einen durch die natürlich vorliegende Biokompatibilität sowie das Vorhandensein zellinteraktiver Komponenten, wie die RGD-Sequenz. Diese besteht aus den drei Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure. Zellen können über ihre Integrinrezeptoren an diese Sequenz binden und adhären.¹⁹⁵ Die Sequenz sorgt jedoch nicht nur für eine mechanische Stabilität der Zellen in der umgebenden Matrix, sie vermittelt auch Signale, die unter anderem die Viabilität oder die Polarität der Zellen beeinflussen.¹⁹⁶ Zum anderen die chemische Kontrollierbarkeit der mechanischen Eigenschaften. Durch die Funktionalisierung der Lysinseitenketten mit MAA können die entstandenen Vinylgruppen über eine Photoreaktion kovalente Bindungen formen,

wodurch die Festigkeit des Hydrogels bestimmt werden und die Stabilität unter physiologischen Bedingungen gewährleistet werden kann^{113,128}. Die Synthese von GelMA-V1 erfolgte nach Van Den Bulcke *et al.*¹¹² Die freien Aminogruppen der Lysinseitenketten reagieren in einer nucleophilen Acylsubstitution mit dem MAA zu dem Photopolymer GelMA. Die Reaktion ist in Abbildung 12 dargestellt.

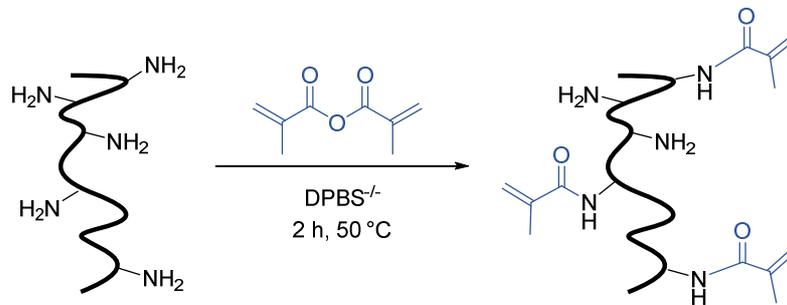


Abbildung 12: Synthese des Photopolymers GelMA. Die primären Aminogruppen der in DPBS⁻ gelösten Gelatine werden mit MAA über eine nucleophile Acylsubstitution zum Photopolymer funktionalisiert.¹¹²

Die Gelatine wurde zunächst bei 50 °C in DPBS⁻ gelöst und anschließend langsam das MAA hinzugegeben. Die Lösung wurde für 2 h gerührt, verdünnt und für sieben Tage gegen destilliertes Wasser (ddH₂O) dialysiert. Nach einer Lyophilisation wurde das Produkt als weißer Feststoff erhalten. Um ein breiteres Anwendungsgebiet zu gewährleisten, wurden unterschiedliche Mengen des MAA (20,2 Äq, 12,6 Äq oder 3,8 Äq) hinzugegeben. So wurden Photopolymere mit einem hohen (GelMA-V1 *high*), einem mittleren (GelMA-V1 *medium*) und einem niedrigen (GelMA-V1 *low*) Funktionalisierungsgrad erhalten. Um den Funktionalisierungsgrad zu bestimmen, wurde der TNBSA-Assay als indirekter Nachweis genutzt. Der Funktionalisierungsgrad ergab sich aus den Absorptionswerten der unfunktionalisierten Gelatine und denen der Photopolymere. Die Berechnung erfolgte mit Formel 1.

$$\text{Funktionalisierungsgrad [\%]} = \left(1 - \frac{A_{\text{Gelatinederivat}}}{A_{\text{Gelatine}}}\right) * 100 \% \quad \text{Formel (1)}$$

Die so ermittelten Funktionalisierungsgrade für GelMA-V1 *low*, *medium* und *high* sind in Abbildung 13 dargestellt.

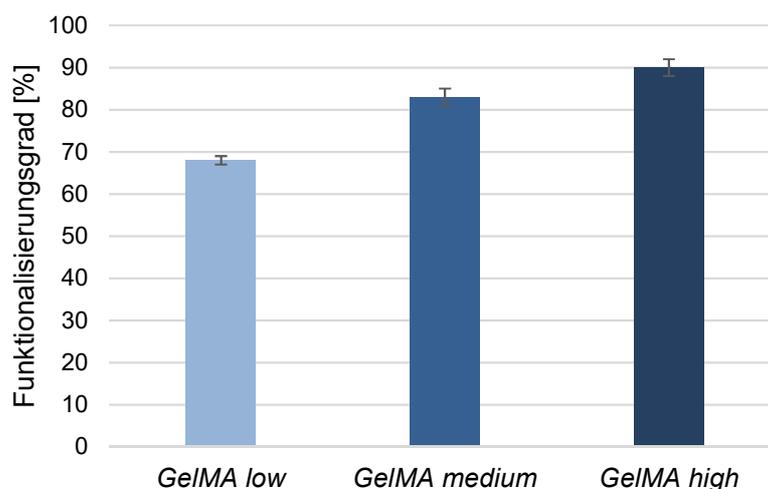


Abbildung 13: Funktionalisierungsgrad der Photopolymere GelMA-V1 low (68 %), GelMA-V1 medium (83 %) und GelMA-V1 high (90 %). Die Funktionalisierungsgrade wurden über den TNBSA-Assay und die Menge freier Aminogruppen bestimmt.

Dabei ergab sich für GelMA-V1 *low* ein Funktionalisierungsgrad von 68 %, für GelMA-V1 *medium* 83 % und für GelMA-V1 *high* 90 %. Somit konnte ein eindeutiger Zusammenhang zwischen den Mengen an zugegebenem MAA und dem erhaltenen Funktionalisierungsgrad festgestellt werden. Zusätzlich wurde auch ein ^1H -NMR-Spektrum von den drei Photopolymeren und Gelatine angefertigt, um den Erfolg der Reaktion sowie den Funktionalisierungsgrad zu bestimmen. Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 14 dargestellt. Die Messung wurde in deuteriertem Wasser (D_2O) bei 400 MHz und 40 °C durchgeführt, um ein Gelieren der Probe während der Messung zu verhindern. Die erfolgreiche Funktionalisierung der Aminogruppen mit MAA konnte an drei Bereichen im Spektrum detektiert werden. Die Peaks der Vinylprotonen bei 5,4 ppm und 5,7 ppm und der Peak der Methylgruppe des Methacrylamids bei 1,9 ppm (in der Abbildung blau hinterlegt) konnten nur in den Photopolymeren detektiert werden, jedoch nicht bei un-funktionalisierter Gelatine. Die zunehmende Signalintensität bei den drei Photopolymeren GelMA-V1 *low*, *medium* und *high* zeigte die zunehmende Funktionalisierung qualitativ auf. Der dritte charakteristische Bereich bei 3,1 ppm (in der Abbildung grün hinterlegt) konnte der freien Aminogruppe zugeordnet werden. Die höchste Signalintensität wies un-funktionalisierte Gelatine auf, während die der Photopolymere von *low* nach *high* hin abnahm, was ebenfalls den Funktionalisierungsgrad bestätigte.

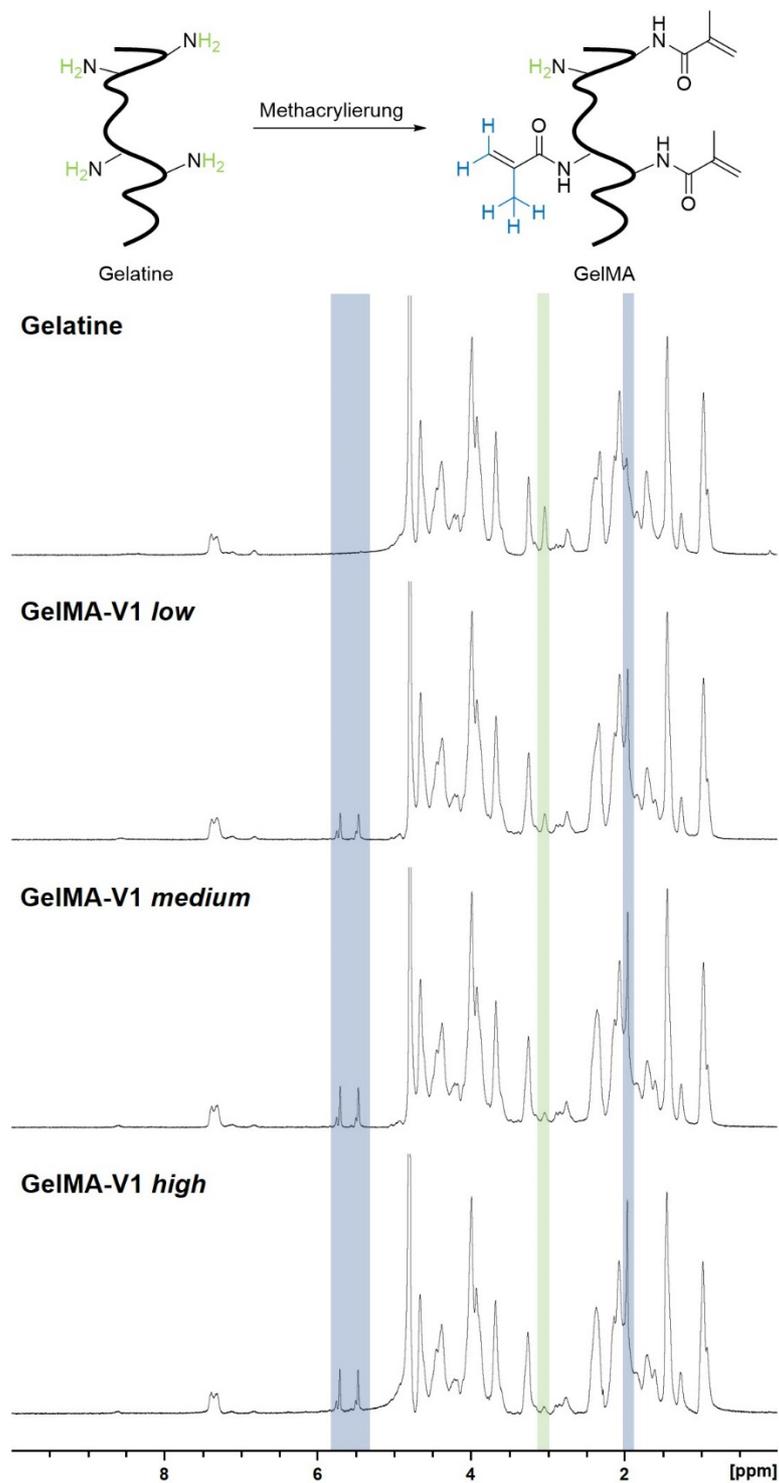


Abbildung 14: $^1\text{H-NMR}$ von Gelatine und dem Photopolymer GelMA-V1 in den drei verschiedenen Funktionalisierungsgraden low, medium und high. Die Messung erfolgte in D_2O bei 400 MHz und 40°C . Die Protonen der freien Aminogruppen sind in grün, die Protonen der Methacrylamidgruppe in blau dargestellt.

Die ermittelten Funktionalisierungsgrade lagen jedoch alle sehr nahe beieinander, mit Werten von 68 % für GelMA-V1 *low* bis 90 % für GelMA-V1 *high*. Die daraus resultierenden Festigkeiten der Hydrogele lagen dementsprechend ebenfalls nahe beieinander. Um ein breiteres Anwendungsgebiet zu gewährleisten, um beispielsweise auch sehr weiche Hydrogele ausbilden zu können, wurde die Synthese in einem weiteren Schritt angepasst, um Photopolymere mit noch unterschiedlicheren Funktionalisierungsgraden zu erhalten.

4.1.3 GelMA-V2

Um das Photopolymer GelMA in verschiedenen Funktionalisierungsgraden von niedrig bis hoch zu erhalten, wurde die Synthese angepasst. Diese wurde ebenfalls nach Van Den Bulcke *et al.* durchgeführt, jedoch wurde die Menge an MAA nun an die Menge der freien Aminogruppen der verwendeten Gelatine angepasst. Dies wurde in Kollaboration mit Tobias Göckler und Xenia Kempter (AK Schepers, Institut für Funktionelle Grenzflächen, KIT) durchgeführt.^{186,187} Die Menge freier Aminogruppen lag bei 0,266 mmol NH₂-Gruppen pro g Gelatine und entsprach 1 Äq. Zunächst wurde eine Synthesereihe erstellt, bei der jeweils 0,5 Äq, 1 Äq, 2 Äq, 4 Äq, 10 Äq, 12 Äq, 16 Äq, 20 Äq und 30 Äq des MAA zur in DPBS^{-/-} gelösten Gelatine gegeben wurden. Bei 1 Äq wurden 0,266 mmol MAA zu einem Gramm Gelatine hinzugegeben. Auch hier wurde die Reaktion für 2 h bei 50 °C gerührt, anschließend verdünnt und für sieben Tage gegen ddH₂O dialysiert. Nach zweitägiger Lyophilisation wurde das Produkt GelMA-V2 als weißer Feststoff erhalten. Um die Funktionalisierungsgrade der Photopolymere aus der Synthesereihe zu bestimmen, wurde der TNBSA-Assay als indirekter Nachweis durchgeführt, da so die Menge freier Aminogruppen ermittelt wurde. Der Funktionalisierungsgrad ergab sich dabei aus den Absorptionswerten reiner Gelatine und denen der zehn verschiedenen Photopolymere. Die Berechnung erfolgte mit Formel 1 (siehe Kapitel 4.1.2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

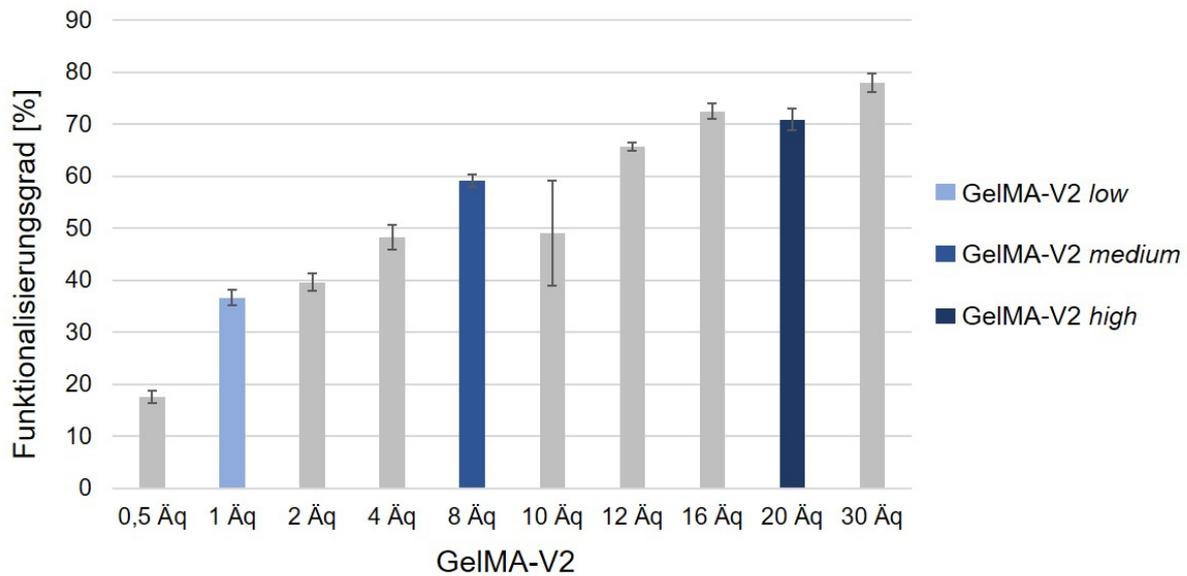


Abbildung 15: Funktionalisierungsgrade der Photopolymere GelMA-V2 aus 10 verschiedenen Syntheseansätzen. Zu 1 g Gelatine wurden jeweils 0,5 bis 30 Äq des MAA hinzugegeben. Die Funktionalisierungsgrade wurden durch den TNBSA-Assay über die Menge freier Aminogruppen bestimmt. Anhand dieser Ergebnisse wurden die drei neuen Varianten des GelMA-V2 festgelegt. GelMA-V2 low mit einem Funktionalisierungsgrad von 36 %, GelMA-V2 medium mit einem Funktionalisierungsgrad von 59 % und GelMA-V2 high mit einem Funktionalisierungsgrad von 71 %.

Bei der Synthesereihe wurden Funktionalisierungsgrade von 18 % für den Ansatz mit 0,5 Äq MAA bis 78 % für den Ansatz mit 30 Äq MAA erhalten. Dazwischen zeigte sich eine zunächst lineare Zunahme des Funktionalisierungsgrades. Ab einer Zugabe von 16 Äq des MAA änderte sich der Funktionalisierungsgrad der Photopolymere GelMA-V2 jedoch nur sehr gering. Aus diesen ermittelten Werten wurden drei neue Photopolymere für die weitere Verwendung bestimmt (in der Abbildung blau hinterlegt). GelMA-V2 low entsprach einem Syntheseansatz mit 1 Äq MAA und wies einen Funktionalisierungsgrad von 36 % auf. GelMA-V2 medium entsprach einem Syntheseansatz mit 8 Äq MAA und wies einen Funktionalisierungsgrad von 59 % auf. GelMA-V2 high entsprach einem Syntheseansatz mit 20 Äq MAA und wies einen Funktionalisierungsgrad von 71 % auf. Somit konnten nochmals zusätzliche Varianten des Photopolymers GelMA synthetisiert werden, die nun sehr weiche Hydrogele (GelMA-V2 low) als auch feste Hydrogele (GelMA-V2 high) ausbilden konnten. Zusätzlich wurde auch für diese Photopolymere, sowie Gelatine ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum angefertigt, um den Erfolg der Reaktion sowie den Funktionalisierungsgrad zu bestimmen. Die Spektren sind in Abbildung 16 dargestellt. Die Messung wurde in D_2O bei 400 MHz und 40 °C durchgeführt, um ein Gelieren der Probe während der Messung zu verhindern. Die erfolgreiche Funktionalisierung der Aminogruppen mit MAA konnte an drei Bereichen im Spektrum detektiert werden. Die Peaks der Vinylprotonen bei 5,4 ppm und 5,8 ppm und der Peak der Methylgruppe des Methacrylamids bei 2,2 ppm (in der Abbildung blau hinterlegt) konnten nur in den Photopolymeren detektiert

werden, jedoch nicht bei reiner Gelatine. Der dritte charakteristische Bereich bei 3,1 ppm (in der Abbildung grün hinterlegt) konnte der freien Aminogruppe zugeordnet werden. Die höchste Signalintensität wies reine Gelatine auf, während die der Photopolymere von *low* nach *high* hin abnahm, was ebenfalls die verschiedenen Funktionalisierungsgrade bestätigte. Zudem konnten einzelne Peaks im Spektrum der Gelatine verschiedenen Aminosäuren zugeordnet werden. Diese sind in Abbildung 16 von 1 bis 12 durchnummeriert.

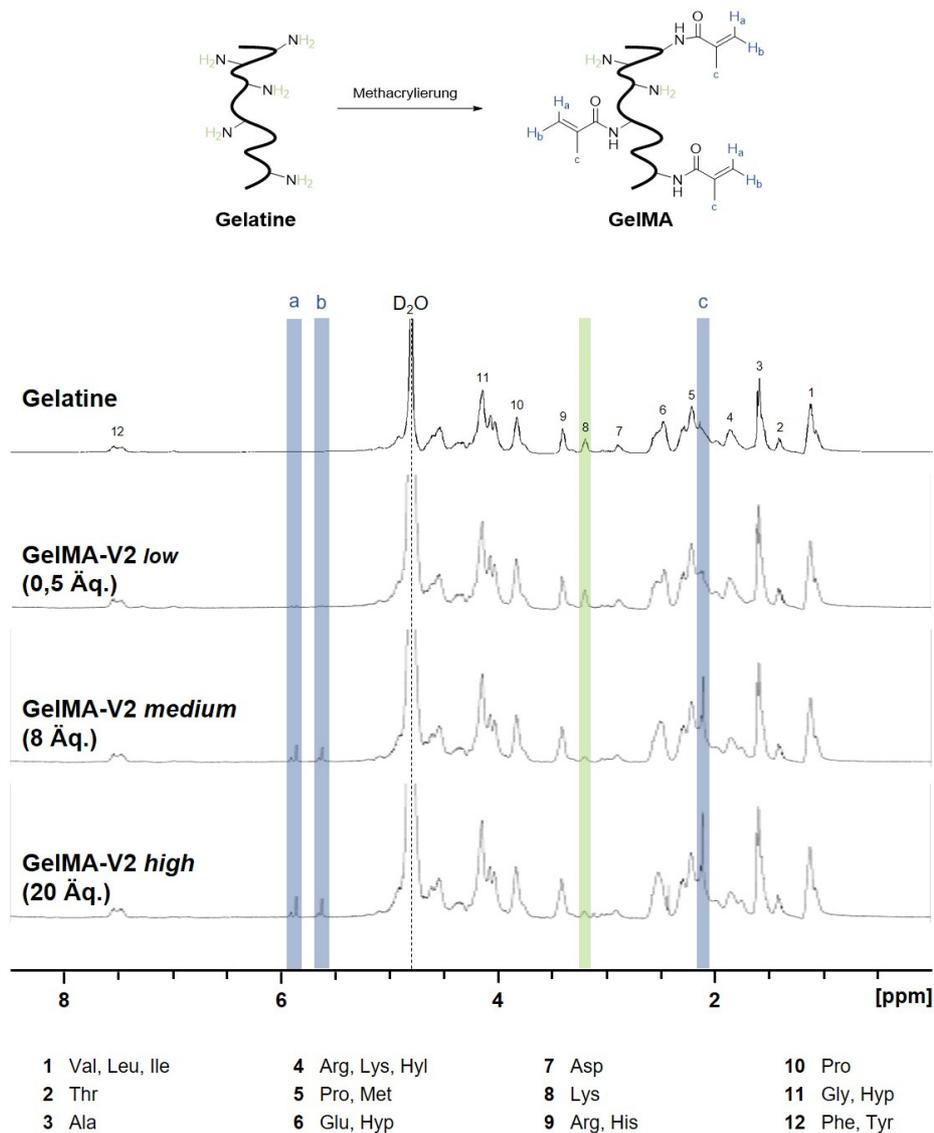


Abbildung 16: ¹H-NMR von Gelatine und dem Photopolymer GelMA-V2 in den drei verschiedenen Funktionalisierungsgraden *low*, *medium* und *high*. Die Messung erfolgte in D₂O bei 400 MHz und 40 °C. Die Protonen der freien Aminogruppen sind in grün, die Protonen der Methacrylamidgruppe in blau dargestellt. Die Zuordnung einzelner Aminosäuren zu verschiedenen Signalen ist mit den Nummern 1-12 beschriftet. Erstellt in Kollaboration mit T. Göckler.¹⁸⁶

4.1.4 GeINB

Da das Photopolymer GelMA nach Zugabe eines Photoinitiators und Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge zum Hydrogel über einen radikalischen Kettenmechanismus vernetzt wird, können sich die gebildeten freien Radikale negativ auf die im Hydrogel enthaltenen Zellen auswirken.¹⁹⁷ Aus diesem Grund wurde in Kollaboration mit Tobias Göckler und Xenia Kemper (AK Schepers, Institut für Funktionelle Grenzflächen, KIT) ein zweites Photopolymer, Norbornen-funktionalisierte Gelatine (GeINB) synthetisiert.^{186,187,198} Dieses Polymer lässt sich nach Zugabe einer Thiolgruppe und eines Photoinitiators über eine radikalisch vermittelte Thiol-En Reaktion zum Hydrogel vernetzen.¹⁹⁹ Da die Thiol-En Reaktion über einen Stufenwachstumsprozess verläuft werden weniger freie Radikale gebildet. Somit generiert dieser Mechanismus eine geringere Anzahl an Zellschäden.²⁰⁰ Für die Synthese wurde auf klassische Methoden der Peptidchemie zurückgegriffen. Die freien Aminogruppen der Gelatine wurden mit Norbornencarboxylsäure mit Hilfe von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid (EDC-HCl) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) zum Photopolymer GeINB funktionalisiert. Die Reaktion ist in Abbildung 17 dargestellt.

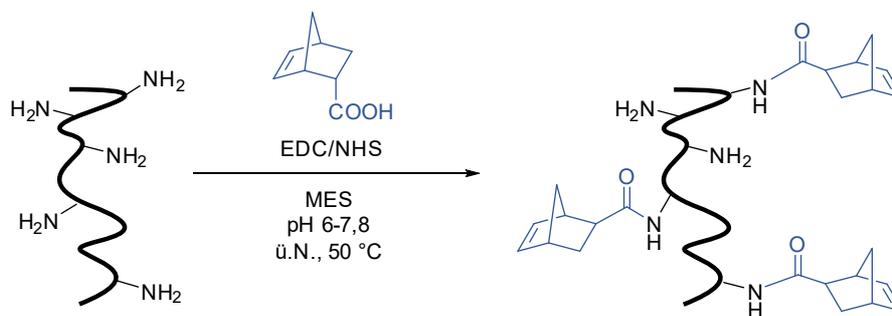


Abbildung 17: Synthese des Photopolymers GeINB. In MES gelöste Norbornencarboxylsäure wird zunächst durch Zugabe von EDC-HCl und NHS aktiviert. Die so aktivierte Carboxylgruppe reagiert anschließend mit den primären Aminogruppen der Gelatine über Nacht zum Photopolymer.

Die in 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) gelöste Norbornencarboxylsäure wurde zunächst mit EDC-HCl bei pH 6 aktiviert und mit NHS in einen stabilen Aktivester umgewandelt.

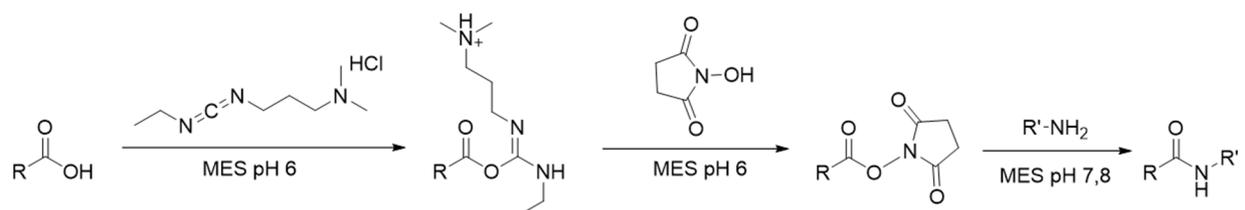


Abbildung 18: Prinzip der Aktivierung von Carbonsäuren durch EDC-HCl und NHS. Zunächst wird die Carbonsäure durch Reaktion mit EDC-HCl aktiviert. Nach Zugabe des NHS wird die Säure in einen stabilen Aktivester umgewandelt, der anschließend mit der Aminogruppe unter Bildung einer Amidgruppe reagiert. Modifiziert nach ThermoFisher.²⁰¹

Nach Zugabe der Gelatine wurde der pH-Wert auf 7,8 erhöht, sodass der entstandene Aktivester mit den freien Aminogruppen der Lysinseitenketten reagieren konnte. Die Reaktion wurde bei 50 °C durchgeführt und über Nacht gerührt. Zur Aufreinigung des Rohprodukts wurde dieses für sieben Tage gegen ddH₂O dialysiert und anschließend lyophilisiert, um das Produkt als weißen Feststoff zu erhalten. Zunächst wurde auch für das Photopolymer GeINB eine Synthesereihe erstellt, bei der jeweils 0,1 Äq bis 10 Äq der Norbornencarboxylsäure mit Gelatine umgesetzt wurden. 1 Äq entsprach dabei 0,266 mmol und somit der Menge an freien Aminogruppen in einem Gramm Gelatine. Zur Bestimmung der Funktionalisierungsgrade der verschiedenen Polymere wurde der TNBSA-Assay als indirekter Nachweis durchgeführt. Der Funktionalisierungsgrad ergab sich dabei aus den Absorptionwerten reiner Gelatine und jenen der verschiedenen Photopolymere. Die Berechnung erfolgte mit Formel 1 (siehe Kapitel 4.1.2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.

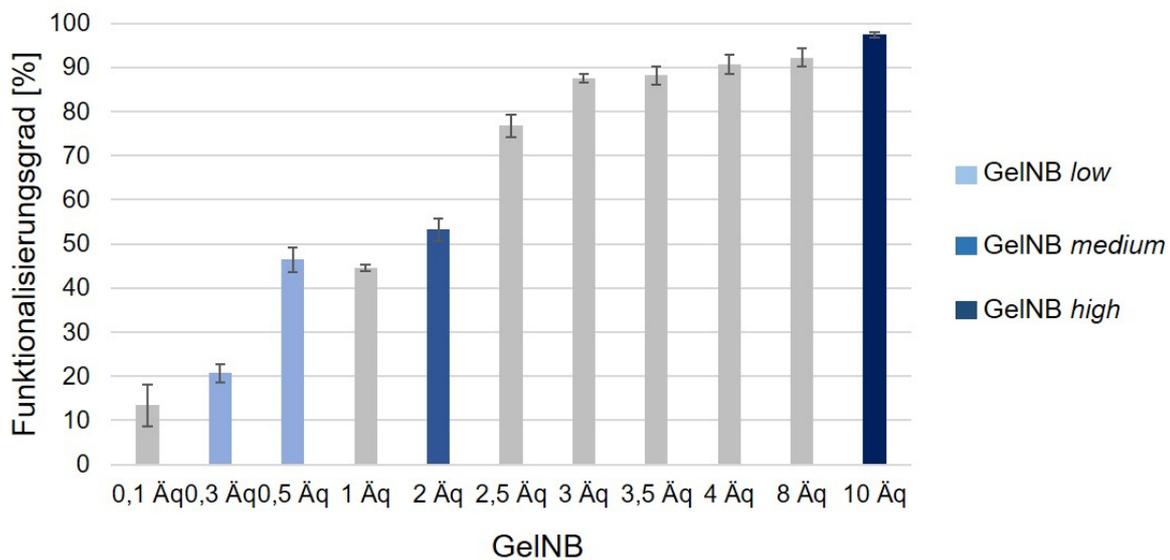


Abbildung 19: Funktionalisierungsgrade der Photopolymere GeINB aus 11 verschiedenen Synthesansätzen. Zu 1 g Gelatine wurden jeweils 0,1 bis 10 Äq der Norbornencarboxylsäure hinzugegeben. Die Funktionalisierungsgrade wurden durch den TNBSA-Assay über die Menge freier Aminogruppen bestimmt. Anhand dieser Ergebnisse wurden die drei GeINB-Varianten festgelegt. GeINB low mit einem Funktionalisierungsgrad von 20 % bzw. 46 %, GeINB medium mit einem Funktionalisierungsgrad von 53 % und GeINB high mit einem Funktionalisierungsgrad von 97 %.

Bei der Synthesereihe wurden Photopolymere mit einem Funktionalisierungsgrad von 13 %, für den Ansatz mit 0,1 Äq Norbornencarboxylsäure, bis zu 97 % für den Ansatz mit 10 Äq Norbornencarboxylsäure erhalten. Auch bei dieser Synthesereihe zeigte sich zunächst eine lineare Zunahme des Funktionalisierungsgrades. Ab 3 Äq war die Änderung jedoch nur sehr gering. Anhand der Ergebnisse wurden drei Photopolymere mit Funktionalisierungsgraden von gering bis hoch ausgewählt und für die weiteren Versuche verwendet. GeINB low entsprach einem Syntheseansatz von 0,3 Äq (Funktionalisierungsgrad 21 %, für GeINB/GeIS-Hydrogele)

oder 0,5 Äq (Funktionalisierungsgrad 46 %, für GelNB/DTT-Hydrogele), GelNB *medium* entsprach einem Syntheseansatz von 2 Äq (Funktionalisierungsgrad 53 %) und GelNB *high* entsprach einem Syntheseansatz von 10 Äq (Funktionalisierungsgrad 97 %). Zusätzlich wurde auch ein ^1H -NMR-Spektrum von den drei Photopolymeren und Gelatine angefertigt, um den Erfolg der Reaktion sowie den Funktionalisierungsgrad zu bestimmen. Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 20 dargestellt. Die Messung wurde in D_2O bei 400 MHz und 40 °C durchgeführt, um ein Gelieren der Probe während der Messung zu verhindern. Die erfolgreiche Funktionalisierung der Gelatine zu den drei Photopolymeren GelNB *low*, *medium* und *high* konnte auch durch das ^1H -NMR-Spektrum nachgewiesen werden. Dabei nahm die Signalintensität des Peaks der freien Aminogruppen (in der Abbildung grün hinterlegt) bei 3,3 ppm ab, je höher der Funktionalisierungsgrad der Polymere. Weitere charakteristische Peaks der Norbornengruppe sind bei 3,2 ppm, 3,7 ppm, 6,2 ppm und 6,4 ppm zu erkennen. Dabei nahm die Signalintensität mit Zunahme des Funktionalisierungsgrads zu. Bei genauerer Auflösung der Spektren konnte der Unterschied in der exo- und endo-Form der Norbornencarboxylsäure den Signalen bei 6,2 ppm, 6,35 ppm und 6,4 ppm zugeordnet werden. Diese liegt als Mischung vor, sodass bei dem Photopolymer GelNB auch beide Formen zu detektieren sind. Der gewählte Syntheseansatz mit Norbornencarboxylsäure, EDC-HCl und NHS erwies sich als sehr effektiv, da verschiedene GelNB Photopolymere mit sehr geringen (12 %) bis sehr hohen (97 %) Funktionalisierungsgraden erhalten wurden. Dieser Syntheseansatz konnte auch von Tytgat *et al.* in einer kürzlich veröffentlichten Publikation erfolgreich durchgeführt werden. Jedoch wurde in diesem Ansatz DMSO als Lösungsmittel für die Reaktion verwendet, sowie Aceton zur Gewinnung des Rohprodukts eingesetzt.²⁰² Diese Lösungsmittel müssen jedoch anschließend durch Aufreinigung des Rohprodukts aufgrund zytotoxischer Effekte komplett entfernt werden.^{203,204} Bei dem hier gewählten Syntheseweg konnte das Photopolymer GelNB lösungsmittelfrei in wässriger Umgebung synthetisiert werden. Dies kann sich positiv auf den Einsatz des Polymers in der Zellkultur auswirken, da keine organischen Lösungsmittelrückstände im Produkt zurückbleiben können.

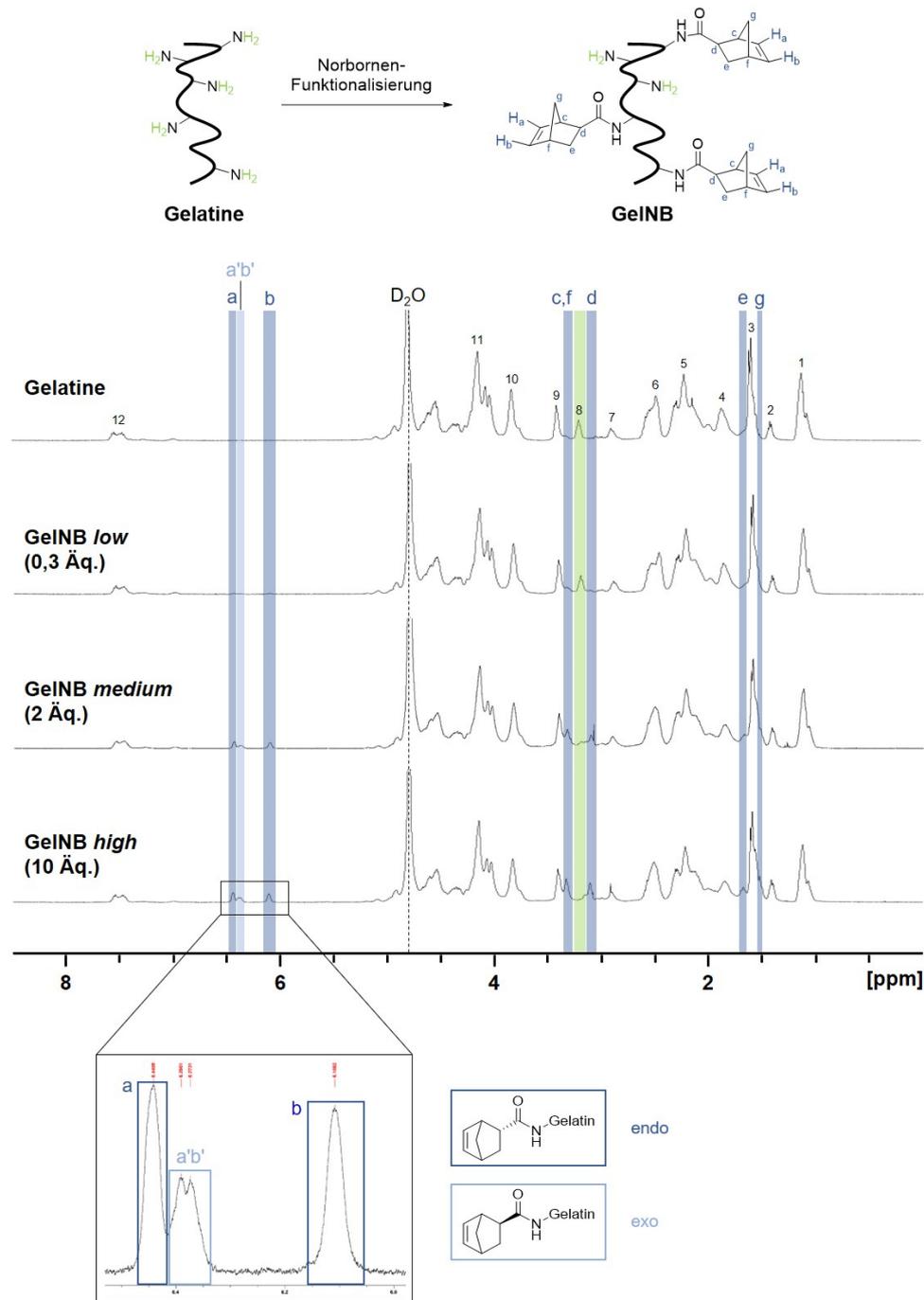


Abbildung 20: 1H -NMR von Gelatine und dem Photopolymer GelNB in den drei verschiedenen Funktionalisierungsgraden low, medium und high. Die Messung erfolgte in D_2O bei 400 MHz und 40 °C. Die Protonen der freien Aminogruppen sind in grün, die Protonen der Norbornengruppe in blau dargestellt. Die Zuordnung einzelner Aminosäuren zu verschiedenen Signalen ist mit den Nummern 1-12 beschriftet (siehe Abbildung 16). Die Signale a,b und a',b' konnten der endo- und exo-Form der Norbornencarboxylsäure zugeordnet werden. Erstellt in Kollaboration mit T. Göckler und X. Kempter.^{186,187}

4.1.5 GeIS

Als weiteres, Gelatine-basiertes Photopolymer, wurde thiolierte Gelatine (GeIS) synthetisiert. Dieses Photopolymer lässt sich, ebenso wie GeINB, nach Zugabe eines Alkens und eines Photoinitiators über die Thiol-En Reaktion zum Hydrogel vernetzen. Dabei wird Gelatine mit N-Acetylhomocysteinthiolacton zum Photopolymer GeIS umgesetzt. Das Thiolacton reagiert unter Ringöffnung in einer nucleophilen Acylsubstitution mit den freien Aminogruppen der Gelatine. Die Reaktion ist in Abbildung 21 dargestellt.

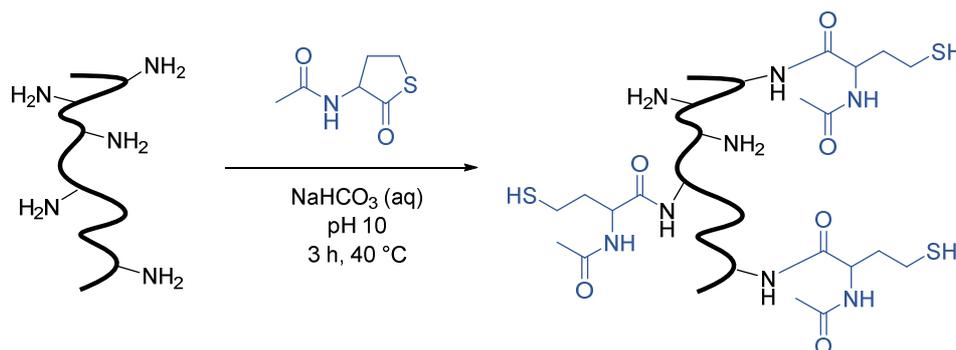


Abbildung 21: Synthese des Photopolymers GeIS. Die primären Aminogruppen der in entgastem Natriumcarbonatpuffer gelösten Gelatine reagieren mit N-Acetylhomocysteinthiolacton über eine nucleophile Acylsubstitution zum Photopolymer.²⁰⁵

Um eine Dimerisierung der Thiolgruppen in Anwesenheit von Sauerstoff (O_2) zu verhindern, wurde sowohl der Natriumcarbonatpuffer als auch das Dialysewasser vor Verwendung entgast. Zusätzlich wurde Ethylentetraessigsäure (EDTA) zur Reaktionslösung gegeben. Die Gelatine wurde zunächst im Reaktionspuffer unter Schutzatmosphäre gelöst. Anschließend wurde das Thiolacton zugegeben und die Lösung für 3 h bei 50 °C gerührt. Zur Aufreinigung des Rohprodukts wurde dieses für 24 h gegen ddH₂O dialysiert und anschließend lyophilisiert. Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten und bis zur Verwendung bei -80 °C unter Schutzatmosphäre gelagert. Diese Reaktion wird schon seit mehreren Jahrzehnten für die Thiolierung von Biomolekülen eingesetzt.²⁰⁶ Auch Gelatine wurde über diesen Syntheseweg schon erfolgreich zum Photopolymer GeIS umgewandelt.²⁰⁵ Zunächst wurde für das Photopolymer GeIS eine Synthesereihe erstellt, bei der verschiedene Äq des Thiolactons zur Gelatine gegeben wurden. 1 Äq entsprach dabei 0,266 mmol/g Gelatine. Zur Bestimmung der Funktionalisierungsgrade der verschiedenen Polymere wurde der TNBSA-Assay als indirekter Nachweis durchgeführt. Der Funktionalisierungsgrad ergab sich dabei aus den Absorptionen reiner Gelatine und denen der verschiedenen Photopolymere. Die Berechnung erfolgte mit Formel 1 (siehe Kapitel 4.1.2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt.

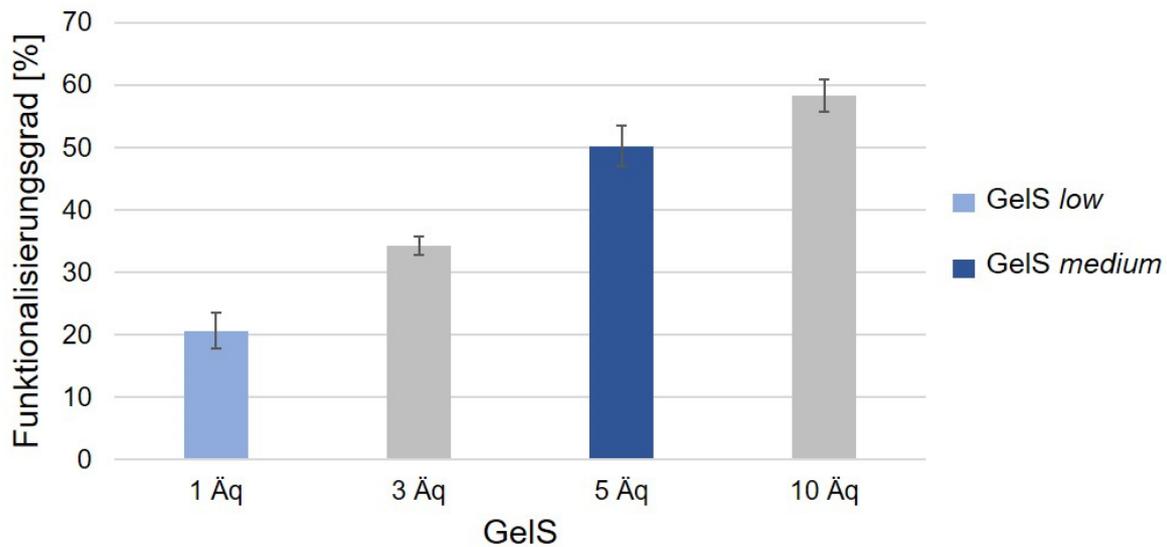


Abbildung 22: Funktionalisierungsgrade der Photopolymere GelS aus vier verschiedenen Synthesansätzen. Zu 1 g Gelatine wurden jeweils 1 bis 10 Äq des N-Acetylhomocysteinthiolactons hinzugegeben. Die Funktionalisierungsgrade wurden durch den TNBSA-Assay über die Menge freier Aminogruppen bestimmt. Anhand dieser Ergebnisse wurden die zwei GelS-Varianten festgelegt. GelS low mit einem Funktionalisierungsgrad von 20 %, und GelS medium mit einem Funktionalisierungsgrad von 50 %.

Auch bei dieser Synthesereihe zeigte sich eine lineare Zunahme des Funktionalisierungsgrads. Es wurden Polymere mit Funktionalisierungsgraden von 20 % (1 Äq Ansatz) bis 58 % (10 Äq Ansatz) erhalten. Höhere Funktionalisierungsgrade konnten nicht erzielt werden, auch bei der Verwendung höherer Äquivalente. Dies ist für diese Reaktion auch in der Literatur bekannt. Vlierberghe *et al.* konnten auf diese Weise GelS mit einem Funktionalisierungsgrad von 65 % synthetisieren.^{205,207} Deshalb wurden nur zwei Photopolymere in den Varianten *low* und *medium* gewählt und für weitere Versuche verwendet. GelS *low* entsprach einem Synthesansatz von 1 Äq und wies einen Funktionalisierungsgrad von 20 % auf. GelS *medium* entsprach einem Synthesansatz von 5 Äq und wies einen Funktionalisierungsgrad von 50 % auf. Zusätzlich wurde auch ein ¹H-NMR-Spektrum von den zwei Photopolymeren und Gelatine angefertigt, um den Erfolg der Reaktion sowie den Funktionalisierungsgrad zu bestimmen. Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 23 dargestellt. Die Messung wurde in D₂O bei 400 MHz und 40 °C durchgeführt, um ein Gelieren der Probe während der Messung zu verhindern. Die erfolgreiche Thiolierung der Gelatine zu GelS konnte qualitativ auch über das ¹H-NMR nachgewiesen werden. Dabei waren zwei Signale charakteristisch. Die Signalintensität des Peaks bei 3,2 ppm der freien Aminogruppen der Gelatine (in der Abbildung grün hinterlegt) nahm bei den Photopolymeren mit zunehmendem Funktionalisierungsgrad ab. Die Peaks bei 2,3 ppm und 2,8 ppm konnten dem Cystein zugeordnet werden (in der Abbildung blau hinterlegt). Die Signalintensität nahm bei zunehmendem Funktionalisierungsgrad zu.

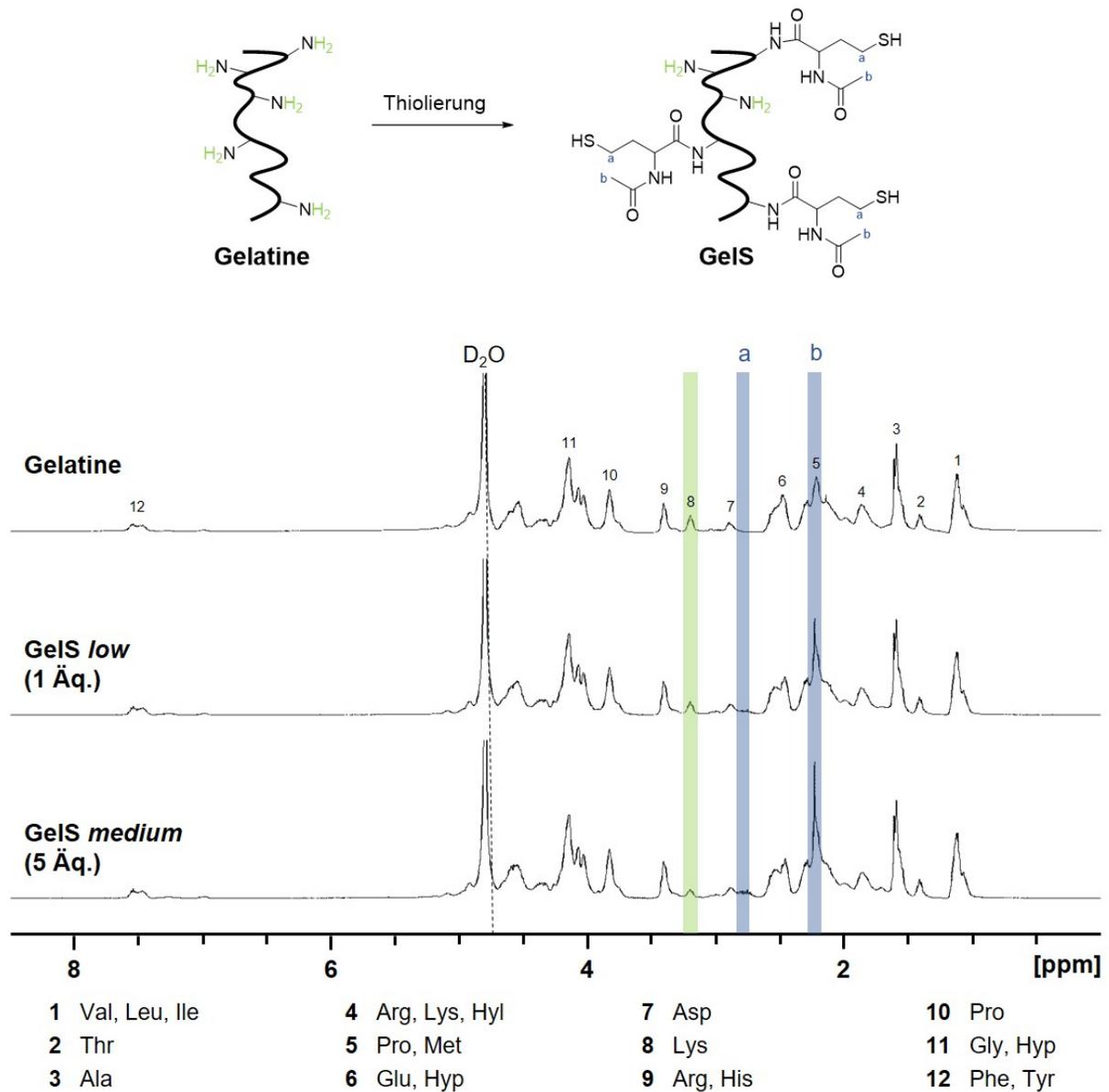


Abbildung 23: ¹H-NMR von Gelatine und dem Photopolymer GeIS in den zwei verschiedenen Funktionalisierungsgraden low, und medium. Die Messung erfolgte in D₂O bei 400 MHz und 40 °C. Die Protonen der freien Aminogruppen sind in grün, die Protonen der Cysteingruppe in blau dargestellt. Die Zuordnung einzelner Aminosäuren zu verschiedenen Signalen ist mit den Nummern 1-12 beschriftet. Erstellt in Kollaboration mit T. Göckler und X. Kempter.^{186,187}

4.2 Charakterisierung der Photoinitiatoren und Crosslinker

Für die Vernetzung der einzelnen Photopolymere zu Hydrogelen wurde die Zugabe eines Photoinitiators benötigt. Dabei standen zwei verschiedene Photoinitiatoren, 2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenon (Irgacure D-2959) und Lithium-Phenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinat (LAP), zur Verfügung. Beide sind wasserlöslich, was sie zu geeigneten Kandidaten für die Photopolymerisationsreaktion macht.²⁰⁸ Die Strukturformeln der beiden Photoinitiatoren sind in Abbildung 24 dargestellt.

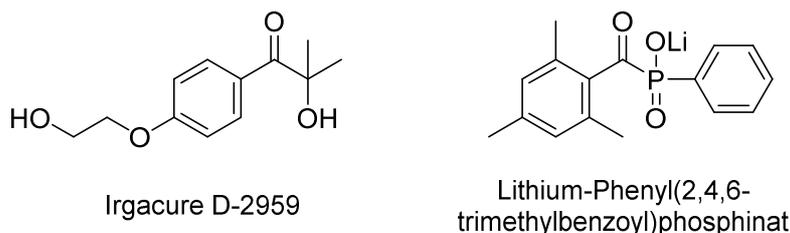


Abbildung 24: Strukturformeln der beiden Photoinitiatoren Irgacure D-2959 und Lithium-Phenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinat (LAP).

Zudem wurde für die Nutzung der Thiol-En Reaktion die Zugabe eines Crosslinkers benötigt. Für das Photopolymer GeINB diente der Crosslinker Dithiothreitol (DTT), dessen Thiolgruppe mit den Vinylgruppen des GeINB in einer Photoreaktion reagiert und so die kovalente Vernetzung ausbildet. Die Strukturformel von DTT ist in Abbildung 25 dargestellt.



Abbildung 25: Strukturformel des Crosslinkers Dithiothreitol (DTT).

Vor Nutzung der Photoinitiatoren und des Crosslinkers zur Vernetzung der einzelnen Photopolymere wurden diese zunächst hinsichtlich ihrer Absorptionsmaxima und Zytotoxizität charakterisiert.

4.2.1 Absorptionsspektren der Photoinitiatoren

Da für die Vernetzung der Photopolymere zwei verschiedene Photoinitiatoren zur Verfügung standen, die beide eine gute Löslichkeit in Wasser zeigten, wurden diese in Kooperation mit Rebecca Pfister (AK Schepers, Institut für Funktionelle Grenzflächen, KIT) in Bezug auf ihre Absorptionsmaxima im für die Ausbildung des Hydrogels verwendeten Lösungsmittel charakterisiert.²⁰⁹ Dafür wurden beide Photoinitiatoren in einer Konzentration von 0,1 % in DPBS^{-/-} gelöst und jeweils ein Absorptionsspektrum von 200 nm bis 400 nm aufgenommen. Dies ist in Abbildung 26 dargestellt.

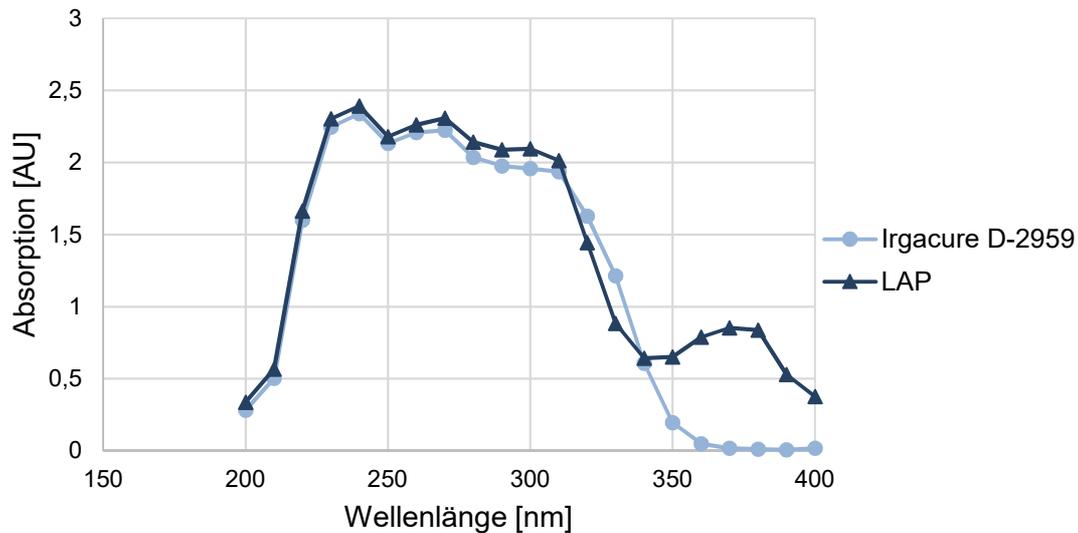


Abbildung 26: Absorptionsspektren der beiden Photoinitiatoren Irgacure D-2959 (0,001 %) und LAP (0,01 %). Es wurde jeweils ein Spektrum von 200 nm bis 400 nm aufgezeichnet. Erstellt in Kollaboration mit R. Pfister.²⁰⁹

Bei dem Photoinitiator Irgacure D-2959 war ein deutliches Maximum bei 270 nm zu erkennen, was sich auch mit den angegebenen Werten in der Literatur deckte.²⁰⁸ Dieser Photoinitiator wird sehr häufig im Bereich der 3D-Zellkultur eingesetzt, um Zellen in Hydrogele einzubetten. Einer der Nachteile ist dabei jedoch, dass durch das Absorptionsmaximum bei 270 nm mit Licht im Ultraviolett-Bereich (UV) gearbeitet werden muss, was sich negativ auf die Zellviabilität auswirkt.²¹⁰ Das Spektrum des Photoinitiators LAP zeigte ebenfalls ein Maximum bei 270 nm auf, jedoch ließ sich ein weiteres Maximum bei 375 nm erkennen, was sich mit den Werten in der Literatur deckte.²⁰⁸ Somit zeigte LAP ein breiteres Absorptionsspektrum als Irgacure D-2959 und konnte dadurch über einen breiteren Wellenlängenbereich angeregt werden. Die Intensität dieses zweiten Maximums lag jedoch deutlich unter dem Maximum bei 270 nm. Dies bedeutet, dass bei 375 nm etwas länger bestrahlt werden muss, da die Absorption des LAP-Moleküls in diesem Bereich schwächer ist. Es kann jedoch Licht mit einer längeren Wellenlänge im annähernd sichtbaren Bereich für die Anregung des LAP eingesetzt werden, was sich positiv auf die Zellviabilität während der Vernetzung der Photopolymerlösungen zum Hydrogel auswirken kann.

4.2.2 Zytotoxizität der Photoinitiatoren

In einem weiteren Schritt wurde die Zytotoxizität der beiden Photoinitiatoren Irgacure D-2959 und LAP mit Hilfe eines 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assays auf zwei verschiedenen Zelltypen in Kooperation mit der Bachelorstudentin Alisa Grimm ermittelt.²¹¹ Zum einen auf einer humanen Leberkarzinomzelllinie (HepG2) und auf primären humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (engl.: *human umbilical vein endothelial*

cells, HUVEC). Da für die Vernetzung der Photopolymere zum Hydrogel der Photoinitiator zugegeben werden muss, kommen Zellen, die in dem Gel eingekapselt werden sollen, in direkten Kontakt mit dem Photoinitiator. Für die Bestimmung der Toxizität wurden zunächst 1×10^4 Zellen pro Well in eine 96-Well Platte ausgesät und mit 0,01 %, 0,03 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,3 % und 0,5 % des jeweiligen Photoinitiators behandelt. Zur weiteren Charakterisierung wurde auch die Toxizität der Belichtungsprodukte von Irgacure D-2959 und LAP ermittelt. Dazu wurde nach Zugabe der Photoinitiatoren zu den Zellen die 96-Well Platte für 30 s unter der Aushärtungslampe Omnicure S2000 bei 500 mW/cm^2 bestrahlt, um den radikalischen Zerfall von Irgacure D-2959 und LAP zu initiieren. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Lösungen aus der Platte abgenommen und durch Kulturmedium ersetzt. Nach weiteren 48 h Inkubation wurde das gelbe MTT-Reagenz zugegeben. Dieses kann von metabolisch aktiven Zellen zu einem violetten Formazan verstoffwechselt werden, welches anschließend durch Lyse der Zellen in Lösung gebracht wird. Die Reaktion des MTT zu Formazan ist in Abbildung 27 dargestellt.

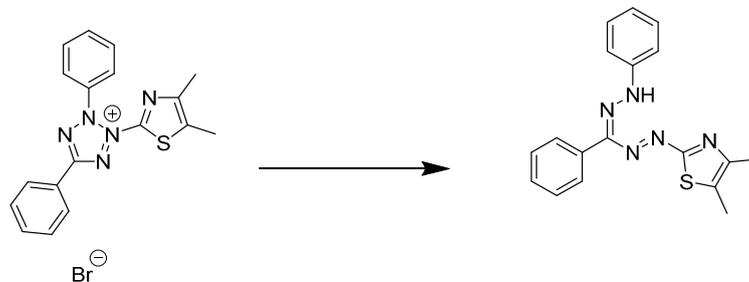


Abbildung 27: Reaktion des gelben MTT-Reagenzes zu einem violetten Formazan. Modifiziert nach Promega.²¹²

Durch eine anschließende Absorptionsmessung bei 595 nm konnte der Anteil lebender Zellen im Vergleich zur Kontrolle bestimmt werden, da die Fluoreszenzintensität des Formazans in direktem Zusammenhang mit dem Anteil lebender Zellen steht. In Abbildung 28 sind die Viabilitäten der HepG2 nach Behandlung mit den Photoinitiatoren Irgacure D-2959 und LAP dargestellt. Teilabbildung A bezieht sich auf die Toxizität der unbelichteten Photoinitiatoren, Teilabbildung B stellt die Toxizität der belichteten Produkte dar.

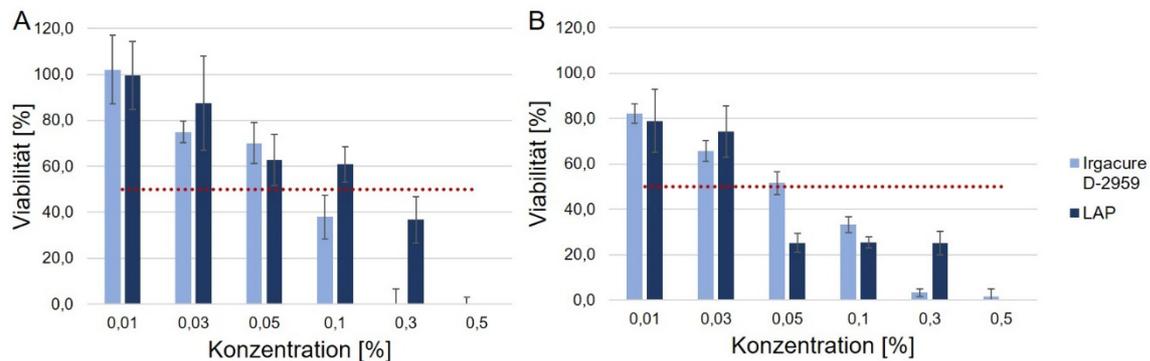


Abbildung 28: Viabilität von HepG2 Zellen nach Behandlung mit Irgacure D-2959 und LAP mit den Konzentrationen 0,01 %, 0,03 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,3 % und 0,5 %. A: Viabilität nach Behandlung mit den unbelichteten Photoinitiatoren. B: Viabilität nach Behandlung mit den Belichtungsprodukten der Photoinitiatoren.

Beim Vergleich der Toxizität der beiden Photoinitiatoren auf HepG2 Zellen ohne Belichtung (siehe Abbildung 28 A) wird deutlich, dass Irgacure D-2959 toxischer auf die Zellen wirkte als LAP. Bei 0,3 % und 0,5 % lag die Zellviabilität bei 0 %, wohingegen für LAP die Viabilität bei 0,03 % noch bei 37 % lag. Der ermittelte LD₅₀-Wert für Irgacure D-2959 betrug 0,08 %. Dies bedeutet, dass bei einer Konzentration von 0,08 % noch 50 % der Zellen lebten. Für LAP konnte anhand der Ergebnisse ein LD₅₀-Wert von 0,19 % bestimmt werden. Somit liegt dieser etwa doppelt so hoch im Vergleich zum LD₅₀-Wert von Irgacure D-2959. Bei einer Konzentration von 0,01 % der beiden Photoinitiatoren zeigten die HepG2 jedoch eine Viabilität von 100 %. Stark zytotoxische Effekte waren erst bei Konzentrationen über 0,05 % zu beobachten. Dies deckte sich mit Werten der Literatur.²¹³ Da die Photoinitiatoren zum Vernetzen der Photopolymerlösungen belichtet wurden, um die Reaktion zu initiieren, wurde ein weiterer Toxizitätstest mit den Belichtungsprodukten durchgeführt. Diese Ergebnisse sind Abbildung 28 B dargestellt. Die belichteten Photoinitiatoren zeigten in diesem Falle eine deutlich erhöhte Toxizität. Bei der geringsten eingesetzten Konzentration von 0,01 % lag die Viabilität der HepG2 für beide Photoinitiatoren lediglich noch bei 80 %. Bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 0,5 % lag die Viabilität für beide Photoinitiatoren bei 0 %. Insgesamt zeigte sich Irgacure D-2959 nach der Belichtung etwas weniger zytotoxisch als LAP. Dies wird auch an den ermittelten LD₅₀-Werten deutlich. Für Irgacure D-2959 lag dieser bei 0,05 %, für LAP bei 0,04 %. Dass die belichteten Photoinitiatoren deutlich toxischer auf die HepG2 Zellen wirkten, deckte sich mit den Erwartungen. Die Belichtung führte zum Zerfall der beiden Photoinitiatoren und zur Bildung von sehr reaktiven freien Radikalen. Diese könnten mit Zellkomponenten interagiert und so die Zellviabilität herabgesetzt haben.^{210,214} Da Krebszelllinien als robuste Zellen gelten, wurde die Toxizitätsbestimmung der beiden Photoinitiatoren auch für primäre Zellen durchgeführt. Diese sind im Gegensatz zu Krebszelllinien nicht immortalisiert und werden aus

frisch isolierten Zellen angezchtet, die häufig die metabolische Kapazität des Ursprungsge-
webes aufweisen.²¹⁵ In diesem Falle wurden HUVEC als primäre Zellen verwendet. Deren
Viabilitäten sind in Abbildung 29 dargestellt.

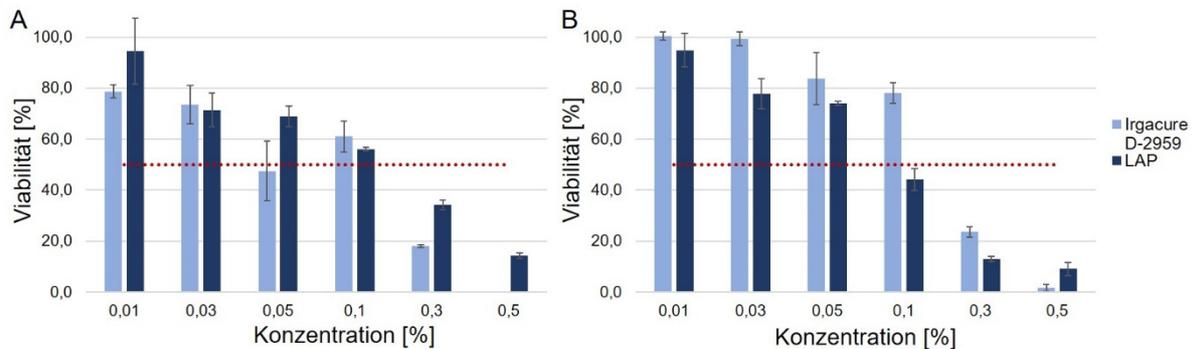


Abbildung 29: Viabilität von HUVEC nach Behandlung mit Irgacure D-2959 und LAP mit den Konzentrationen 0,01 %, 0,03 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,3 % und 0,5 %. A: Viabilität nach Behandlung mit den unbelichteten Photoinitiatoren. B: Viabilität nach Behandlung mit den Belichtungsprodukten der Photoinitiatoren.

Teilabbildung A stellt die Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung der beiden Photoinitiatoren ohne Belichtung dar. Dabei zeigte LAP bei höheren Konzentrationen geringere toxische Effekte als Irgacure D-2959. So lag die Viabilität der HUVEC bei einer Konzentration von 0,5 % für LAP bei 18 %, wohingegen die Viabilität für Irgacure D-2959 bei 0 % lag. Bei geringen Konzentrationen von unter 0,03 % wiesen beide Initiatoren jedoch Zellviabilitäten von über 70 % auf. Die ermittelten LD₅₀-Werte lagen mit 0,15 % für Irgacure D-2959 und 0,16 % für LAP nahe beieinander. Die Toxizität der Belichtungsprodukte ist in Teilabbildung B dargestellt. Hier wies Irgacure D-2959 für Konzentrationen unter 0,3 % eine geringere Toxizität als LAP auf. Dies wurde auch durch die Bestimmung der LD₅₀-Werte bestätigt. So lag der Wert für Irgacure D-2959 nach Belichtung bei 0,2 %, wohingegen der für LAP bei 0,09 % lag. Die Zerfallsprodukte von LAP übten somit stärkere toxische Effekte auf die HUVEC Zellen auf als die des Irgacure D-2959. Bei Konzentrationen von 0,03 % und 0,01 % konnten für Irgacure D-2959 Viabilitäten von 100 % ermittelt werden. Sowohl bei den unbelichteten als auch bei den belichteten Photoinitiatoren konnten Viabilitätswerte von über 50 % bei Konzentrationen von 0,1 % oder geringer erreicht werden.

Insgesamt übten Irgacure D-2959 und LAP deutlich toxischere Effekte auf die HepG2 Zellen aus. Besonders die Belichtungsprodukte der beiden Initiatoren setzten die Viabilität der Krebszellen deutlich herab. Die Leberkrebszellen könnten von den freien Radikalen deutlich stärker angegriffen worden sein als die primären Endothelzellen. Eventuell könnten auch Bestandteile der Kulturmedien der Zellen die Radikalbildung unterstützt beziehungsweise gemindert haben, da für beide Zelltypen verschiedene Kulturmedien eingesetzt werden. Das Medium der HUVEC verfügt über eine größere Anzahl zugesetzter Wachstumsfaktoren und Zucker, welche die Bildung freier Radikale vermindert haben könnten.

Anhand der ermittelten Ergebnisse der Absorptionsbestimmung und der Zytotoxizität der beiden Photoinitiatoren Irgacure D-2959 und LAP wurde für die weitere Vernetzung der verschiedenen Photopolymere zum Hydrogel LAP verwendet, da dieser bei höheren eingesetzten Konzentrationen von 0,3 % sowohl für HepG2 als auch für HUVEC einen geringeren toxischen Effekt zeigte. Zudem wurde für die Photopolymerisationsreaktionen als Aushärtungslampe das Omnicure S2000 (igb-Tech) eingesetzt. Der Lichtleiter dieses Aushärtungssystems deckte einen Wellenlängenbereich von 320 nm bis 500 nm ab und lag somit teilweise im sichtbaren Bereich. Da für LAP sowohl bei 300 nm als auch bei 375 nm ein Absorptionsmaximum detektiert wurde, für Irgacure D-2959 nur eines bei 300 nm, stimmte das Maximum von LAP besser mit dem Wellenlängenbereich der Aushärtungslampe überein.

4.2.3 Zytotoxizität DTT

Um den Crosslinker DTT bei der Vernetzung des Photopolymers GelNB einzusetzen, wurde dieser zunächst auf seine Zytotoxizität hin untersucht, da dieser vor der Vernetzung zur Photopolymerlösung gegeben wird. Sollen später Zellen in den Hydrogelen eingekapselt werden, kommen diese vor der Vernetzung direkt in Kontakt mit dem Crosslinker. Da der Zeitraum des Zusetzens des Crosslinkers bis zur Vernetzung der Photopolymere zum Hydrogel ein Vorgang ist, der im Minuten- bis Stundenbereich stattfindet, falls die Lösung mit einem 3D-Drucker verarbeitet wird, wurde die Toxizität zu drei verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Dies wurde in Kooperation mit dem Masterstudenten Dominik Feser mit Hilfe des MTT-Assay auf HepG2 Zellen in Konzentrationen von 1 bis 15 mM und zu den drei Zeitpunkten 10 min, 3 h und 72 h hin untersucht.²¹⁶ Dafür wurden zunächst 1×10^4 HepG2 Zellen pro Well in eine 96-Well Platte ausgesät und mit den verschiedenen Konzentrationen an DTT behandelt. Da DTT zu den Reduktionsmitteln zählt und dadurch die Ergebnisse des MTT-Assay verfälschen kann, wurde an den entsprechenden Zeitpunkten die Lösung entfernt, die Zellschicht zweimal mit DPBS⁻ gewaschen und mit neuem Kulturmedium überschichtet. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C weiter inkubiert, bis 72 h erreicht waren. Daraufhin erfolgte die Auswertung durch die Zugabe des MTT-Reagenzes und die Absorptionsmessung bei 595 nm. Die Viabilitäten der HepG2 nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an DTT zu den verschiedenen Zeitpunkten ist in Abbildung 30 dargestellt.

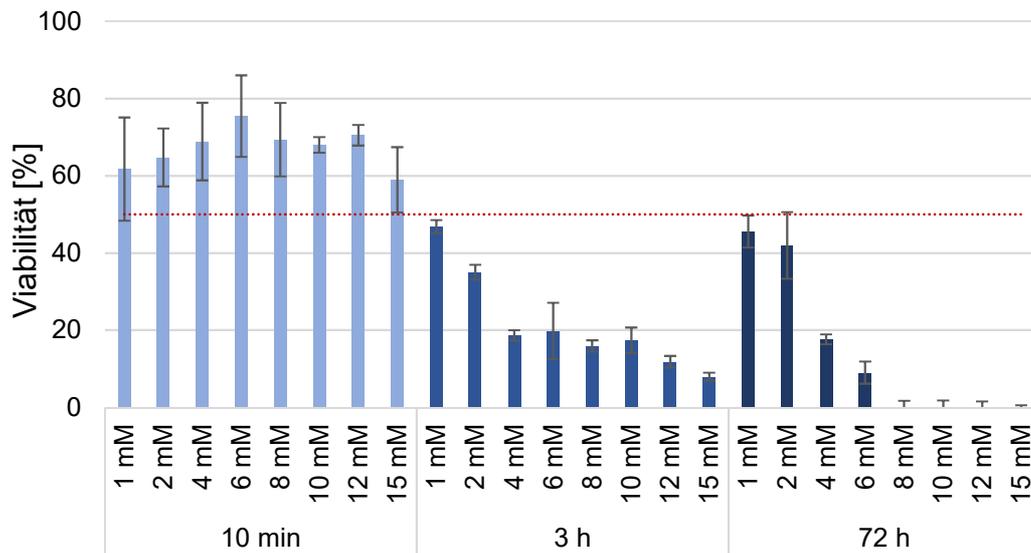


Abbildung 30: Viabilität von HepG2 Zellen nach Behandlung mit DTT in den Konzentrationen 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 15 mM über die drei Zeiträume 10 min, 3 h und 72 h.

Nach einer Inkubationsdauer von 10 min waren für alle getesteten Konzentrationen Viabilitäten von 60 % bis 75 % zu ermitteln. Auch mit zunehmender Konzentration konnte keine signifikante Abnahme der Viabilität detektiert werden. Nach einer Inkubationszeit von 3 h wiesen die HepG2 deutlich geringere Viabilitäten auf. So lag diese bei einer Konzentration von 1 mM bei 47 % und sank mit zunehmender Konzentration von DTT weiter ab. Bei 15 mM lag der Anteil lebender Zellen lediglich bei 7 %. Nach einer Behandlungsdauer von 72 h lag die Viabilität der HepG2 bei einer Konzentration von 1 mM bei 45 %, sank mit steigender Konzentration jedoch kontinuierlich ab. Ab einer Konzentration von 8 mM lag die Zellviabilität bei 0 %. Ein LD₅₀-Wert konnte für alle drei Zeitpunkte nicht bestimmt werden, da die Viabilitäten nach 10-minütiger Inkubationszeit für alle untersuchten Konzentrationen bei über 50 % und für die Inkubationszeiten von 3 h und 72 h bei unter 50 % lagen. Die starke zytotoxische Wirkung dieses Crosslinkers konnte jedoch aufgezeigt werden und ist auch aus der Literatur bekannt.²¹⁷ DTT kann durch Luftsauerstoff sehr schnell oxidiert werden und unter anderem zur Bildung von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und freier Radikale führen, welche oxidativen Stress in den Zellen auslösen können.^{218,219} Für die Vernetzung der Hydrogele waren besonders drei Konzentrationen interessant, da diese für die Vernetzung des Photopolymers GelNB eingesetzt werden sollten. GelNB *low* sollte dabei mit einer DTT Konzentration von 5,4 mM vernetzt werden, GelNB *medium* mit einer Konzentration von 8 mM und GelNB *high* mit einer Konzentration von 15 mM. Dies wurde anhand des in Kapitel 4.1.1 bestimmten Gehalts an freien Aminogruppen pro Gramm Gelatine und den ermittelten Funktionalisierungsgraden der drei Photopolymere berechnet, sodass die Menge an DTT mit einem leichten Überschuss der Menge an funktionalisierten Aminogruppen entsprach. Nach einer Inkubationszeit von 10 min lagen die Viabilitäten

dabei für die drei Konzentrationen bei 58 % (15 mM) bis 70 % (6 mM und 8 mM). Bei einer Inkubationszeit von 3 h lagen die Viabilitäten der HepG2 für alle drei interessanten Konzentrationen zwischen 20 % und 10 %. Nach einer Inkubationszeit von 72 h konnte lediglich bei einer Konzentration von 6 mM noch eine Viabilität von 10 % ermittelt werden. Somit wurde aus der Toxizitätsbestimmung deutlich, dass bei Einsatz des Crosslinkers DTT zügig gearbeitet werden musste, um die Zellen nur für eine sehr kurze Zeit mit diesem in der Photopolymerlösung in Kontakt zu bringen.

4.3 Charakterisierung der Aushärtungsbedingungen

In einem weiteren Schritt wurden die Aushärtungsbedingungen der einzelnen Photopolymere zu vernetzten Hydrogelen charakterisiert. Dabei wurde zunächst die Phototoxizität der Strahlung des eingesetzten Aushärtungssystems bei verschiedenen Leistungen bestimmt, anschließend die Aushärtungszeiten der Hydrogele näher charakterisiert und die endgültigen Bedingungen für die Aushärtung der verschiedenen Photopolymere zum Hydrogel festgelegt.

4.3.1 Bestrahlungstoxizität

Da sich Strahlung, besonders im UV-Bereich, negativ auf die Zellviabilität auswirken kann, wurde zunächst die Phototoxizität der eingesetzten Strahlung (320-500 nm) für die beiden Zelltypen HepG2 und HUVEC bestimmt.²²⁰ Da ein Teil dieser Strahlung im UVA Bereich liegt (315-400 nm), könnte dies einen toxischen Effekt auf die Zellen ausüben. Um den schädlichen Einfluss der Strahlung während der Vernetzung so gering wie möglich zu halten, wurde ermittelt, ob sich der Einsatz geringerer Leistungsdichte und längerer Aushärtungszeiten oder höherer Leistungsdichte und kürzerer Aushärtungszeiten negativer auf die Viabilität der Zellen auswirken. Zur Bestimmung der Toxizität wurde in Zusammenarbeit mit der Masterstudentin Xenia Kempter der MTT-Assay durchgeführt.¹⁸⁷ Dazu wurden zunächst 1×10^4 Zellen pro Well in eine 96-Well Platte ausgesät. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen mit unterschiedlichen Bedingungen bestrahlt. Diese sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: *Bestrahlungsbedingungen für die Charakterisierung der Strahlungstoxizität auf HepG2 und HUVEC. Die Bestrahlung erfolgte mit der Aushärtungslampe Omnicure S2000 in dem Wellenlängenbereich von 320-500 nm.*

Watt-Leistung [mW/cm²]	Bestrahlungszeit [s]
500	5, 15, 30
1500	3, 5, 10
5000	1, 3

Im Anschluss an die Bestrahlung wurde die Viabilität bestimmt, um direkt zu detektieren, ob nekrotische Zellen vorhanden waren, oder die Platte für weitere 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂

inkubiert, um spätere Effekte der Bestrahlung auf die Viabilität zu detektieren. Die ausgewählten Bedingungen ergaben sich aus einer zuvor im Arbeitskreis durchgeführten Charakterisierung der Aushärtungszeiten des Photopolymers GelMA mit einer zugesetzten LAP-Konzentration von 0,3 %. Dabei wurde die Zeit bis zur Vernetzung für den Leistungsbereich von 500 mW/cm² bis 5000 mW/cm² ermittelt. Es zeigte sich, dass mit zunehmender Leistung die Zeit bis zur Aushärtung immer kürzer wurde.¹⁸⁷ Anhand dieser Ergebnisse wurden die Leistung der Aushärtungslampe und die Bestrahlungszeiten für die Toxizitätsbestimmung gewählt. Um eventuelle Unterschiede zwischen Krebszellen und Primärzellen zu detektieren, wurde der Test sowohl mit HepG2 als auch mit HUVEC durchgeführt. Die Viabilitäten der HepG2 sind in Abbildung 31 dargestellt.

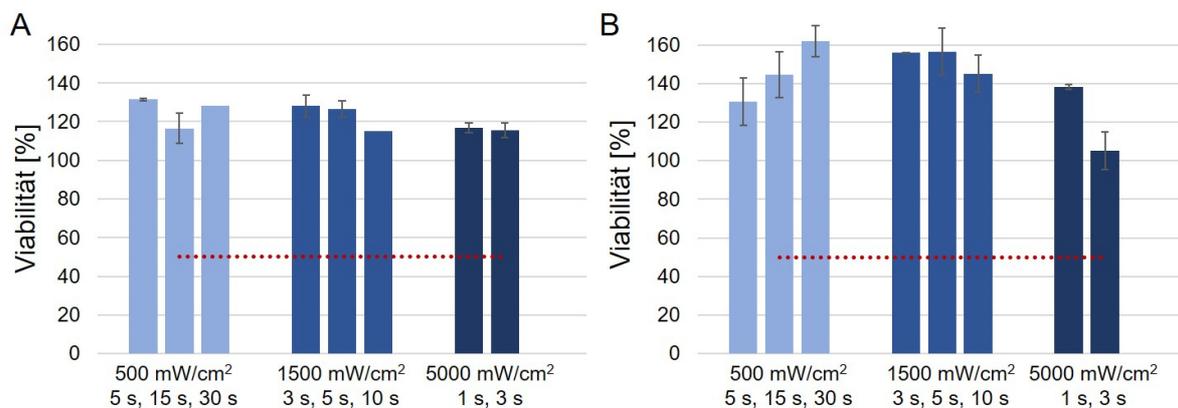


Abbildung 31: Viabilität von HepG2 Zellen nach Bestrahlung mit 500 mW/cm² für 5 s, 15 s und 30 s, Bestrahlung mit 1500 mW/cm² für 3 s, 5 s, und 10 s sowie Bestrahlung mit 5000 mW/cm² für 1 s und 3 s. **A:** Viabilität direkt nach Bestrahlung. **B:** Viabilität 24 h nach Bestrahlung.

Abbildung 31 A zeigt die Viabilitäten der HepG2 Zellen direkt nach der Bestrahlung mit der Aushärtungslampe Omnicure S2000. Diese lagen bei allen untersuchten Strahlungsintensitäten und Bestrahlungsdauern im Vergleich zur Kontrolle über 100 %. Einzelne Unterschiede zwischen den verschiedenen Zeiten ließen sich nicht ausmachen. Die Viabilität der HepG2 nach 24 h lag nochmals deutlich über 100 %. Dies ist in Abbildung 31 B dargestellt. So wiesen die Zellen Viabilitäten von 130 % bis 160 % auf. Lediglich bei einer Bestrahlungsintensität von 5000 mW/cm² und einer Bestrahlungsdauer von 3 s zeigten die HepG2 Zellen eine ähnliche Viabilität wie die unbehandelte Kontrolle. Die Bestrahlung könnte sich demnach positiv auf die Proliferation der Zellen ausgewirkt haben. Jedoch konnten mit diesem Assay keinerlei Aussagen über mögliche DNA-Schäden getroffen werden. Die hier teilweise verwendete UVA-Strahlung wird jedoch, im Gegensatz zu den niedrigwelligeren UVB- (280-315 nm) und UVC-Strahlungen (200-280 nm), nicht direkt von der DNA absorbiert und löst daher keine direkten Photoschäden aus.²²¹ Die toxischen Effekte von UVA-Strahlung resultieren primär aus der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (engl.: *reactive oxygen species*, ROS).²²² Häufen diese sich in der Zelle an, kann sich dies negativ auf den Metabolismus der Zellen auswirken.²²³ Da die Zellen bei der Viabilitätsbestimmung jedoch das gelbe MTT-Reagenz zum violetten Formazan

verstoffwechself, konnte von einem geringen Einfluss auf die metabolische Aktivität der Zellen ausgegangen werden. Um den Einfluss der Strahlung auch auf die häufig sensitiveren Primärzellen zu untersuchen, wurde der MTT-Assay in einem nächsten Schritt mit HUVEC durchgeführt. Diese wurden ebenfalls mit den drei unterschiedlichen Strahlungsintensitäten 500, 1500 und 5000 mW/cm² über verschiedene Dauern bestrahlt. Diese sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die resultierenden Viabilitäten sind in Abbildung 32 dargestellt.

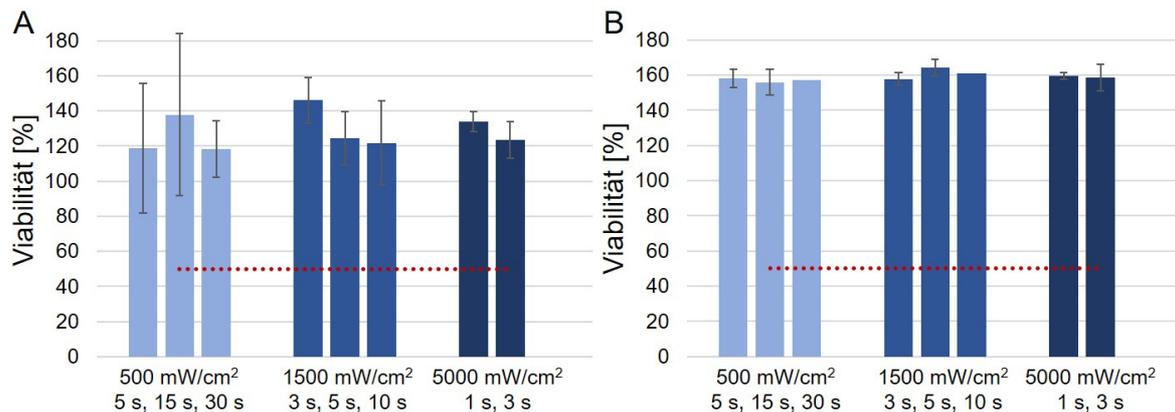


Abbildung 32: Viabilität von HUVEC nach Bestrahlung mit 500 mW/cm² für 5 s, 15 s und 30 s, Bestrahlung mit 1500 mW/cm² für 3 s, 5 s, und 10 s sowie Bestrahlung mit 5000 mW/cm² für 1 s und 3 s. **A:** Viabilität direkt nach Bestrahlung. **B:** Viabilität 24 h nach Bestrahlung.

Abbildung 32 A stellt die Ergebnisse direkt nach der Bestrahlung der HUVEC dar. Die Viabilitäten lagen bei allen untersuchten Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle bei 120 %. Auch war kein deutlicher Unterschied innerhalb der verschiedenen Bestrahlungsdauern auszumachen. Nach 24 h lag die Viabilität der HUVEC für alle Bedingungen bei 160 %. Somit war auch für diesen Zelltyp kein negativer Einfluss der Strahlung auf die Viabilität zu detektieren (siehe Abbildung 32 B). Da die Viabilität nach 24 h bei 160 % lag, konnte eher von einem proliferationsfördernden Einfluss ausgegangen werden.

Da sich bei beiden Zelltypen kein schädlicher Einfluss der verschiedenen Parameter feststellen ließ, wurde die Bestrahlungsintensität für die Vernetzung der Photopolymere zum Hydrogel auf 500 mW/cm² festgelegt. Bei Bestrahlungen mit 5000 mW/cm² konnte eine stärkere Wärmeentwicklung beobachtet werden. Um diese zu verhindern, wurde die niedrige Bestrahlungsintensität für weitere Versuche gewählt.

4.3.2 Polymerisationszeiten

Um aus den verschiedenen Photopolymeren GelMA, GelNB und GelS vernetzte Hydrogele zu erhalten, mussten diese über eine Photoreaktion chemisch vernetzt werden. Aufgrund des Absorptionsspektrums und der geringeren Zytotoxizität wurde dafür der Photoinitiator LAP verwendet. Die Bestrahlungsintensität der Aushärtungslampe Omnicure S2000 wurde nach der Charakterisierung der Phototoxizität auf 500 mW/cm^2 festgelegt. Um nun die benötigte Menge des Photoinitiators und die Polymerisationszeit festzulegen, wurden die Photopolymerlösungen mit eventuell benötigten Crosslinkern versetzt und verschiedene Konzentrationen an LAP (0,3 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,03 % und 0,01 %) zugegeben. Anschließend wurde die Polymerisationszeit bis zur optisch sichtbaren Aushärtung bestimmt. Die Bestrahlung erfolgte mit Licht in einem Wellenlängenbereich von 320-500 nm. Die Überprüfung der Aushärtung erfolgte alle 5 Sekunden, wurde aber bei beginnender sichtbarer Vernetzung auf eine Sekunde verkürzt. Dies wurde in Kollaboration mit Tobias Göckler und Xenia Kempfer (AK Schepers, Institut für Funktionelle Grenzflächen, KIT) durchgeführt.^{186,187}

4.3.2.1 GelMA-V1

Um aus dem Photopolymer GelMA-V1 ein vernetztes Hydrogel auszubilden, erfolgte die Zugabe des Photoinitiators LAP und die Bestrahlung unter der Aushärtungslampe Omnicure S2000. Ein zusätzlicher Crosslinker musste nicht zugegeben werden, da die einzelnen Vinylgruppen der Methacrylamidreste untereinander in einer radikalischen Kettenpolymerisation reagieren und so ein kovalent vernetztes Hydrogel ausbilden. Dies ist in Abbildung 33 dargestellt.

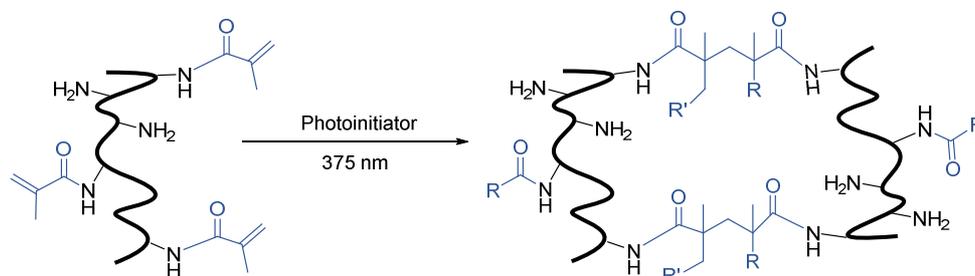


Abbildung 33: Photopolymerisation zur Bildung des vernetzten GelMA-Hydrogels. Nach Zugabe eines Photoinitiators und Bestrahlung mit Licht bilden sich zwischen den funktionalisierten Seitenketten kovalente Bindungen aus und formen ein vernetztes Hydrogel.

Ein Nachteil dieser Polymerisationsart ist die mögliche Bildung inhomogener Netzwerke. So können auch Methacrylamidgruppen, welche sich an demselben Gelatinestrang befinden, untereinander reagieren, wodurch einzelne Ketten untereinander nicht mehr vollständig verknüpft werden können.^{224,225} Zudem entsteht, bedingt durch den Kettenmechanismus, eine hohe Anzahl freier Radikale, welche die Zellmembranen oder Proteine der Zellen schädigen können.²²⁶ Jedoch konnte das Hydrogel GelMA bereits zum erfolgreichen Aufbau von Geweben verwendet werden.^{191,227}

Zur Bestimmung der Polymerisationszeit des GelMA-Hydrogels wurde das Photopolymer GelMA-V1 in den Varianten *low*, *medium* und *high* zunächst jeweils als 10 %ige Stammlösung in DPBS^{-/-} angesetzt. Anschließend wurde die Lösung mit DPBS^{-/-} verdünnt und der Photoinitiator LAP in Konzentrationen von 0,3 % bis 0,01 % zugegeben, sodass die Polymerkonzentration der Lösung 5 % betrug. Jeweils 70 µl der Lösung wurden in die Wells einer 96-Well Platte gegeben und unter der Aushärtungslampe Omnicure S2000 in einem Abstand von 5 cm mit 500 mW/cm² bestrahlt. Die Vernetzungszeiten bis zur optischen Aushärtung der Hydrogele sind in Abbildung 34 dargestellt.

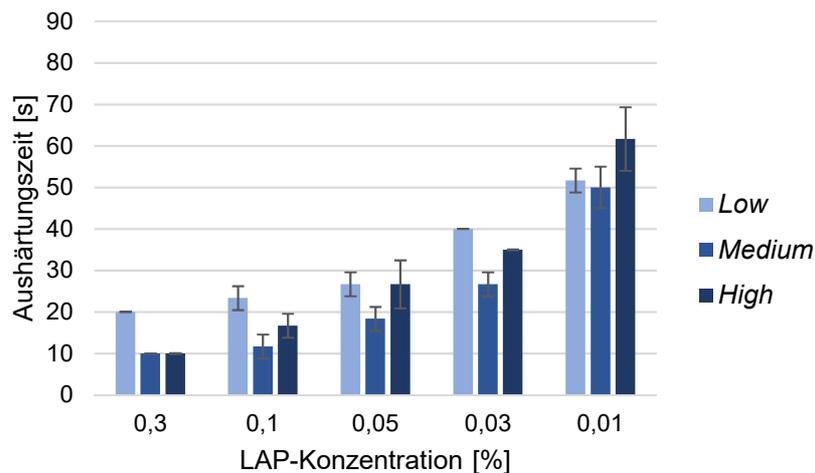


Abbildung 34: Aushärtungszeiten der Photopolymere GelMA-V1 *low*, *medium* und *high* mit verschiedenen zugesetzten Konzentrationen des Photoinitiators LAP (0,3 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,03 % und 0,01 %). Die Bestrahlung erfolgte mit der Aushärtungslampe Omnicure S2000 in einem Abstand von 5 cm und einer Intensität von 500 mW/cm². Der Wellenlängenbereich der Strahlung lag bei 320-500 nm.

So zeigte sich für eine Reduktion der Photoinitiatorkonzentration von 0,3 % auf 0,01 % ein Anstieg der Aushärtungszeiten von 10-20 s auf 50-60 s. Dies entsprach den Erwartungen, da durch eine Verminderung der Photoinitiatormenge nach Bestrahlung weniger freie Radikale zur Initiierung der Polymerisation zur Verfügung standen. Bei einer Konzentration von 0,3 % konnte ein Unterschied zwischen den Funktionalisierungsgraden *low*, *medium* und *high* detektiert werden. *Low* benötigte für eine sichtbare Aushärtung mit 20 s doppelt so lang im Vergleich zu *medium* und *high*. Auch bei Konzentrationen von 0,1 % und 0,03 % lag die Aushärtungszeit für *low* über jenen der anderen beiden Funktionalisierungsgrade. Dies könnte auf der geringeren verfügbaren Anzahl an Methacrylamidgruppen basieren. GelMA-V1 *low* wies mit 68 % den niedrigsten Funktionalisierungsgrad der drei Photopolymere auf. Dadurch könnte die Vernetzung in diesem Fall mehr Zeit benötigt haben, da sich die Vinylgruppen für eine Vernetzung in räumlicher Nähe zueinander befinden müssen. Bei der niedrigsten getesteten Konzentration von 0,01 % konnte dieser Effekt jedoch nicht mehr beobachtet werden, dort benötigte *high* mit über 60 s bis zur sichtbaren Aushärtung die längste Zeit. Die Ergebnisse der Aushärtungszei-

ten zeigten, dass sich die Photopolymere GelMA-V1 *low*, *medium* und *high* bei allen untersuchten Konzentrationen des Photoinitiators mit der Aushärtungslampe Omnicure S2000 zum Hydrogel vernetzen ließen.

4.3.2.2 GelMA-V2

Das Photopolymer GelMA-V2 unterschied sich nur in den einzelnen Funktionalisierungsgraden der Varianten *low*, *medium* und *high* vom Photopolymer GelMA-V2. Die Bildung des Hydrogels aus GelMA-V2 erfolgte deshalb wie in Kapitel 4.3.2.1 beschrieben und ist in Abbildung 33 dargestellt. Zur Bestimmung der Polymerisationszeit bei Zugabe verschiedener Konzentrationen des Photoinitiators LAP wurde das Photopolymer als 10 %ige Lösung in DPBS^{-/-} gelöst und durch den Photoinitiator und weiteres DPBS^{-/-} auf eine Polymerkonzentration von 5 % verdünnt. Die Lösungen wurden anschließend wie in Kapitel 4.3.2.2 unter der Aushärtungslampe Omnicure S2000 bis zur sichtbaren Aushärtung belichtet. Die ermittelten Aushärtungszeiten sind in Abbildung 35 aufgeführt.

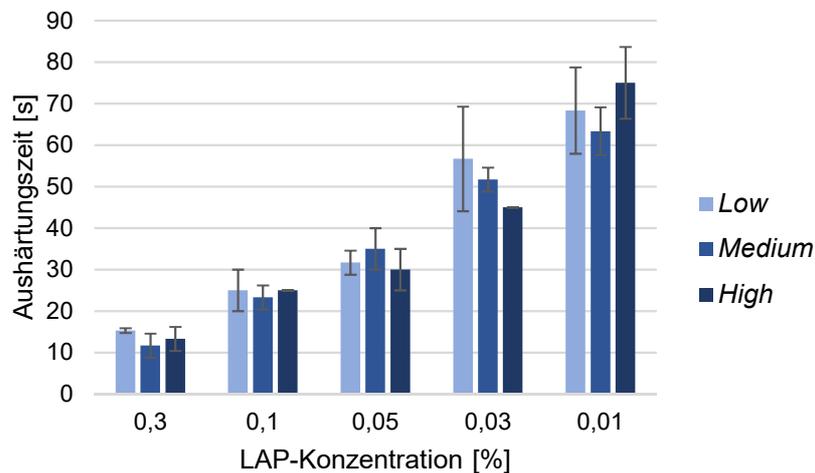


Abbildung 35: Aushärtungszeiten der Photopolymere GelMA-V2 *low*, *medium* und *high* mit verschiedenen zugesetzten Konzentrationen des Photoinitiators LAP (0,3 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,03 % und 0,01 %). Die Bestrahlung erfolgte mit der Aushärtungslampe Omnicure S2000 in einem Abstand von 5 cm und einer Intensität von 500 mW/cm². Der Wellenlängenbereich der Strahlung lag bei 320-500 nm.

Die Aushärtungszeit der Hydrogele bis zur Vernetzung nahm mit sinkender Photoinitiatorkonzentration, wie erwartet, zu. So lag diese bei einer Konzentration von 0,3 % bei 15 s und stieg bei einer Konzentration von 0,01 % auf 60 s bis 75 s an. Dieser Effekt konnte auch bei dem Photopolymer GelMA-V1 beobachtet werden und resultiert aus der geringeren Menge freier Radikale, die für die Vernetzung der einzelnen Polymerstränge benötigt wurde. Im Gegensatz zu GelMA-V1 konnte hier keine Abhängigkeit der Aushärtungszeit von den Funktionalisierungsgraden *low*, *medium* und *high* detektiert werden. Diese betragen bei den Konzentrationen von 0,3 %, 0,1 % und 0,05 % für alle drei Varianten gleich lang. Bei einer Konzentration

von 0,03 % wies GelMA-V2 *low* die längste Aushärtungszeit mit 55 s auf, bei einer LAP-Konzentration von 0,01 % wies GelMA-V2 *high* jedoch die längste Aushärtungszeit auf. Der Test zeigte jedoch, dass sich auch dieses Photopolymer bei allen eingesetzten Konzentrationen des Photoinitiators zum festen Hydrogel vernetzen ließen.

Anhand der Ergebnisse für die beiden Photopolymere GelMA-V1 und GelMA-V2 wurde die zugegebene Menge des LAP-Photoinitiators für weitere Vernetzungen auf 0,3 % festgelegt, da hier die Polymerisationszeiten mit 10 s bis 20 s für GelMA-V1 und 15 s für GelMA-V2 sehr gering waren. Somit konnte ein zügiges Arbeiten sichergestellt werden und im Gel eingekapselte Zellen wurden nur für wenige Sekunden der Strahlung der Aushärtungslampe ausgesetzt.

4.3.2.3 GelNB/DTT

Um aus dem Photopolymer GelNB ein vernetztes Hydrogel auszubilden, wurde die Thiol-En Reaktion genutzt. Dafür musste ein zusätzlicher Thiol-Crosslinker und der Photoinitiator LAP zu GelNB zugegeben und die Lösung unter der Aushärtungslampe Omnicure S2000 bestrahlt werden. Als Crosslinker wurde in dieser Arbeit DTT verwendet. Nach Bestrahlung zerfällt der Photoinitiator in freie Radikale, welche eine Stufenpolymerisation auslösen, bei der die Thiolgruppen des Crosslinkers mit den Norbornengruppen der funktionalisierten Gelatineketten reagieren. Dies ist in Abbildung 36 dargestellt.

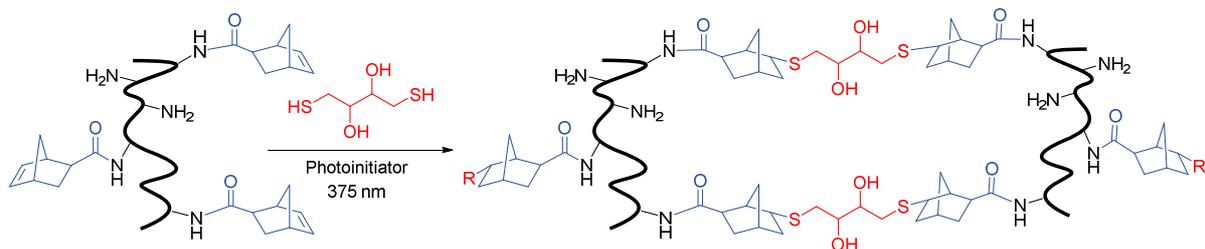


Abbildung 36: Photopolymerisation zur Bildung des vernetzten GelNB/DTT-Hydrogels. Nach Zugabe eines Photoinitiators, des Crosslinkers DTT und Bestrahlung mit Licht bilden sich zwischen den Norbornengruppen des GelNB und den Thiolgruppen des DTT kovalente Bindungen aus und formen ein vernetztes Hydrogel.

Durch den dabei stattfindenden Stufenwachstumsprozess werden weniger freie Radikale gebildet und es findet keine Homopolymerisation statt.¹⁹⁹ Dieser Vorgang ist in Abbildung 37 schematisch dargestellt.

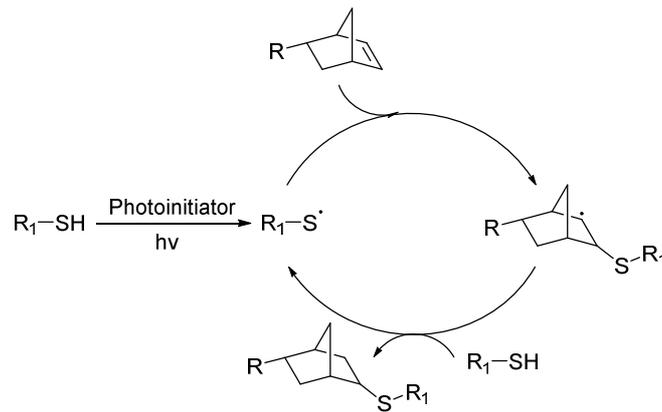


Abbildung 37: Prinzip der Stufenpolymerisation der Thiol-En Reaktion. Dargestellt ist hier die Reaktion von Thiolen mit einer Norbornengruppe. Modifiziert nach Lin et al.²²⁸

Dadurch weist diese Polymerisationsart eine höhere Biokompatibilität gegenüber der Kettenpolymerisation auf.²²⁸ Zudem zeichnet sich die Reaktion durch hohe Ausbeuten, milde Reaktionsbedingungen und eine Unempfindlichkeit gegen Sauerstoff und Wasser aus, wodurch sie sich sehr gut für die Vernetzung von Hydrogelen eignet.²²⁹ Für die Ausbildung der GelNB/DTT-Hydrogele mit den drei GelNB-Varianten *low*, *medium* und *high* wurden jeweils unterschiedliche Konzentrationen DTT eingesetzt. GelNB *low* konnte dabei mit einer DTT Konzentration von 5,4 mM vernetzt werden, GelNB *medium* mit einer Konzentration von 8 mM und GelNB *high* mit einer Konzentration von 15 mM. Dies wurde anhand des in Kapitel 4.1.1 bestimmten Gehalts an freien Aminogruppen pro Gramm Gelatine und den ermittelten Funktionalisierungsgraden der drei Photopolymere berechnet, sodass die Menge an DTT mit einem leichten Überschuss der Menge an funktionalisierten Aminogruppen entsprach. Zur Bestimmung der Aushärtungszeiten wurden die Photopolymere zunächst als 10 %ige Stammlösung in DPBS^{-/-} angesetzt und anschließend mit DTT, den verschiedenen Konzentrationen LAP und DPBS^{-/-} verdünnt, sodass die endgültige Polymerkonzentration der Lösung 5 % betrug. Jeweils 70 μ l der Lösung wurden in die Wells einer 96-Well Platte gegeben und unter der Aushärtungslampe Omnicure S2000 in einem Abstand von 5 cm mit 500 mW/cm² bestrahlt. Die Vernetzungszeiten bis zur optischen Aushärtung der Hydrogele sind Abbildung 38 dargestellt.

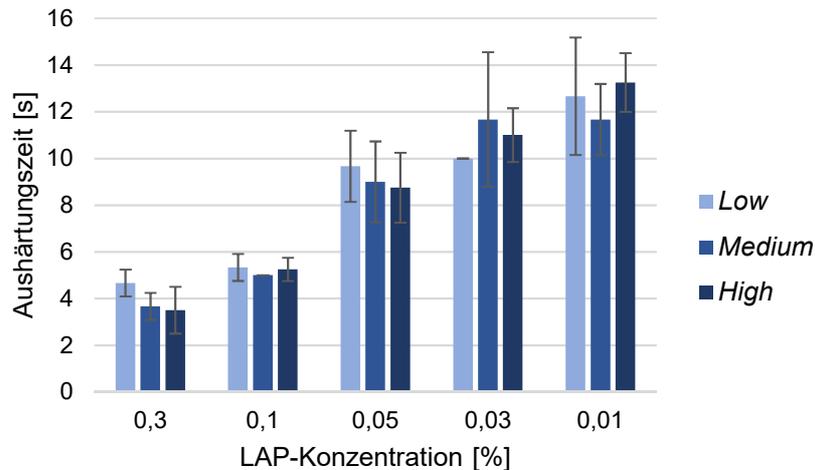


Abbildung 38: Aushärtungszeiten der Photopolymere GelNB low, medium und high mit dem Crosslinker DTT und verschiedenen zugesetzten Konzentrationen des Photoinitiators LAP (0,3 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,03 % und 0,01 %). Die Bestrahlung erfolgte mit der Aushärtungslampe Omnicure S2000 in einem Abstand von 5 cm und einer Intensität von 500 mW/cm². Der Wellenlängenbereich der Strahlung lag bei 320- 500 nm.

Wie Abbildung 38 zu entnehmen ist, zeigte sich auch für die Vernetzung von GelNB/DTT eine Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer von der zugesetzten Photoinitiatorkonzentration. So lag die Aushärtungszeit bei einer LAP-Konzentration von 0,3 % bei etwa 4 s und nahm mit sinkender Konzentration des Photoinitiators zu. Bei einer Konzentration von 0,01 % betrug die Aushärtungszeit der Photopolymerlösungen etwa 12 s. Ein Unterschied zwischen den drei Funktionalisierungsgraden low, medium und high konnte nicht detektiert werden. Im Vergleich mit den Aushärtungszeiten der Photopolymere GelMA (siehe Kapitel 4.3.2.1 und Kapitel 4.3.2.2, zum sichtbar ausgehärteten Hydrogel, zeigte sich ein deutlicher Unterschied. Die Bestrahlungszeiten für GelNB/DTT lagen im Bereich von einigen wenigen Sekunden, auch bei einer LAP-Konzentration von 0,01 %. GelMA benötigte, bis zur sichtbaren Aushärtung, dagegen über 60 s bei dieser Photoinitiatorkonzentration. Dieser Effekt stellte somit einen weiteren Vorteil der Thiol-En Reaktion dar. Da im Vergleich zur radikalischen Kettenpolymerisation mit geringeren Belichtungszeiten gearbeitet werden konnte.

Anhand dieser Resultate wurde die LAP-Konzentration für weitere Experimente für die Vernetzung von GelNB/DTT auf 0,03 % festgelegt. Da diese Menge auch für geringe Volumina der Photoinitiatorlösung noch pipettiert werden konnte. Für eine Konzentration von 0,01 % wären jeweils relativ große Ansätze der Polymerlösungen benötigt worden. Zudem zeigte sich zwischen diesen beiden Konzentrationen lediglich ein Unterschied von etwa 1,5 s bei den Aushärtungszeiten.

4.3.2.4 GeINB/GeIS

Eine weitere Möglichkeit aus dem Photopolymer GeINB ein vernetztes Hydrogel auszubilden war die Zugabe des Photopolymers GeIS, welches mit einem Thiolacton funktionalisiert wurde, sodass es freie Thiolgruppen besaß. Somit wurde für die Bildung des GeINB/GeIS kein weiterer Crosslinker benötigt, da die beiden Polymerketten nach Initiierung durch einen Photoinitiator in einer Thiol-En Reaktion miteinander zum kovalent vernetzten Hydrogel reagieren konnten. Dies ist in Abbildung 39 dargestellt.

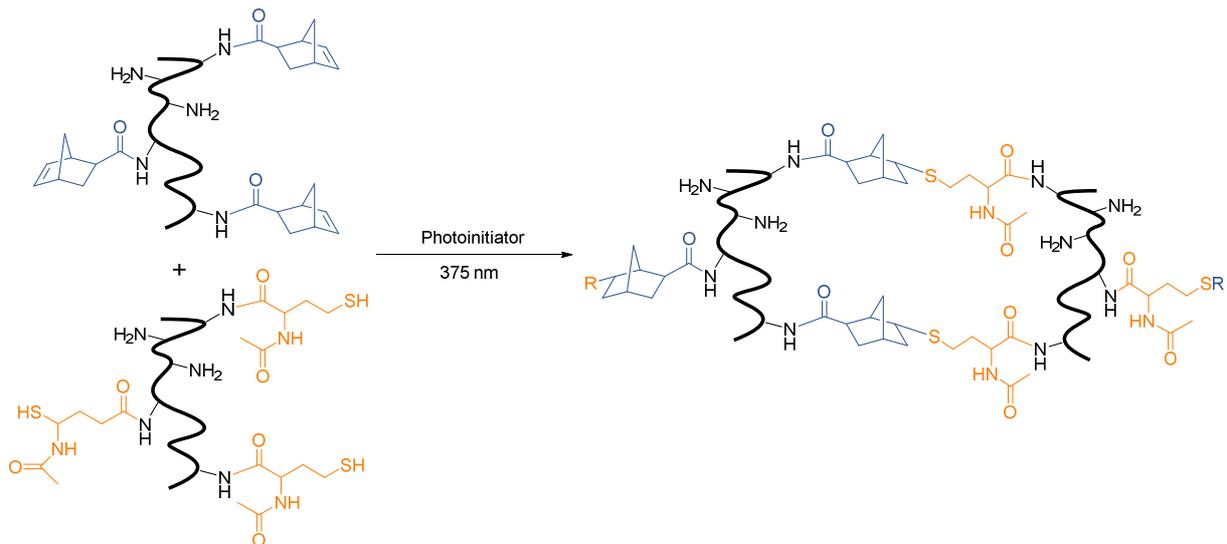


Abbildung 39: Photopolymerisation zur Bildung des vernetzten GeINB/GeIS-Hydrogels. Nach Mischen der beiden Photopolymere GeINB und GeIS, Zugabe eines Photoinitiators, und Bestrahlung mit Licht bilden sich zwischen den Norbornengruppen des GeINB und den Thiolgruppen des GeIS kovalente Bindungen aus und formen ein vernetztes Hydrogel.

Ein Vorteil dieser Kombination der beiden Photopolymere GeINB und GeIS ist der Verzicht auf Zugabe eines weiteren Vernetzers, wie z.B. DTT. Durch eine Untersuchung der Toxizität dieses Crosslinkers konnte die toxische Wirkung auf Zellen bereits nach einer Inkubationsdauer von 3 h detektiert werden. Da es sich bei DTT um ein Reduktionsmittel handelt, kann dieses die Struktur von Proteinen zerstören und somit negativ auf Zellen wirken.²³⁰ Durch Kombination der beiden Photopolymere GeINB und GeIS konnte auf die Zugabe verzichtet werden. Zur Ausbildung der vernetzten Hydrogele in den Varianten *low*, *medium* und *high* wurden die beiden Photopolymere in verschiedenen Zusammensetzungen miteinander kombiniert. Dabei mussten die beiden Photopolymere die gleichen Funktionalisierungsgrade aufweisen, sodass eine vollständige Reaktion der Thiol- und Norbornengruppen untereinander stattfinden konnte. Für das GeINB/GeIS *low*-Hydrogel wurde das Photopolymer GeINB *low* mit dem Photopolymer GeIS *low* in einem Verhältnis von 50:50 gemischt. Für ein *medium*-Hydrogel wurden die Photopolymere GeINB *medium* und GeIS *medium* ebenfalls in einem Verhältnis von 50:50 gemischt. Da bei der Synthese des Photopolymers GeIS kein Funktionalisierungsgrad über 55 % erreicht wurde, wurde für die Bildung des GeINB/GeIS *high*-Hydrogels das Photopolymer GeIS

medium in einer größeren Menge zum Photopolymer GeINB *high* (Funktionalisierungsgrad 97 %) gegeben. Das Mischungsverhältnis betrug 65:35 und wurde über die einzelnen Funktionalisierungsgrade der beiden Polymere berechnet, sodass die Thiol- und die Norbornengruppen in gleichen Mengen vorlagen. Die genaue Zusammensetzung zur Bildung der Hydrogele in den drei Varianten ist in Tabelle 14, Kapitel 6.2.5.4, aufgeführt.

Zur Bestimmung der Aushärtungszeiten wurden die Photopolymere in DPBS⁻ gelöst und verschiedene Mengen des LAP-Photoinitiators zugegeben. Anschließend erfolgte die Bestrahlung der Polymerlösung mit der Aushärtungslampe Omnicure S2000 bei 500 mW/cm² und einem Abstand von 5 cm. Die Ergebnisse der Aushärtungszeiten sind in Abbildung 40 dargestellt.

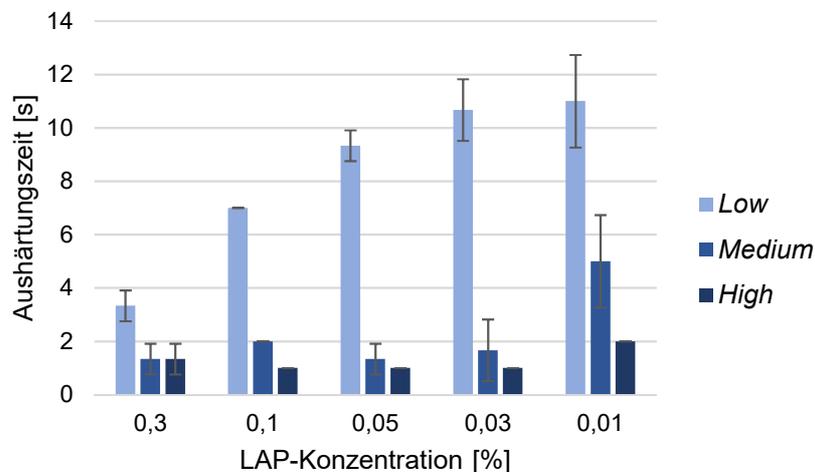


Abbildung 40: Aushärtungszeiten der Photopolymere GeINB/GeIS *low*, *medium* und *high* mit verschiedenen zugesetzten Konzentrationen des Photoinitiators LAP (0,3 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,03 % und 0,01 %). Die Bestrahlung erfolgte mit der Aushärtungslampe Omnicure S2000 in einem Abstand von 5 cm und einer Intensität von 500 mW/cm². Der Wellenlängenbereich der Strahlung lag bei 320-500 nm.

Bei der Vernetzung der Polymerlösungen zu den GeINB/GeIS-Hydrogelen zeigte sich für *low* ein ähnliches Verhalten wie bei der Vernetzung von GeINB/DTT. Die Aushärtungszeiten betrugen nur wenige Sekunden und lagen auch bei einer Konzentration des LAP von 0,01 % für *low* bei nur 12 s. Im Gegensatz zu den GelMA- und GeINB/DTT-Hydrogelen konnte hier eine wesentliche Zunahme der Belichtungszeiten mit einer Reduktion der Photoinitiatormenge nur für die *low*-Variante des Gels detektiert werden. Die Aushärtungszeiten für *medium* und *high* lagen für alle zugesetzten LAP-Konzentrationen bei etwa 2 s. Lediglich bei einer Konzentration von 0,01 % wies die *medium*-Variante eine Zeit von 5 s bis zur optisch sichtbaren Aushärtung auf. Der Unterschied zwischen *low* und *medium* bzw. *high* könnte auf dem niedrigen Funktionalisierungsgrad (20 %) der *low*-Variante basieren. Dadurch blieb das Gel auch nach der Vernetzung weich, was zu Fehlern bei der Detektion der Belichtungszeiten geführt haben könnte. Ein weiterer Grund, weshalb die Vernetzung in diesem Fall mehr Zeit benötigte, könnte das geringe Vorhandensein von Thiol- und Norbornengruppen im *low*-Hydrogel sein, da sich die

beiden funktionellen Gruppen für eine Vernetzung in räumlicher Nähe zueinander befinden müssen. Der Unterschied in den Aushärtungszeiten zwischen GelNB/DTT und GelNB/GelS könnte über den unterschiedlichen Reaktionsverlauf erklärt werden. So muss für eine Vernetzung des GelNB/DTT zum Hydrogel der Crosslinker DTT in zwei aufeinanderfolgenden Schritten mit einer Norbornengruppe reagieren, während für die Vernetzung von GelNB/GelS zum Hydrogel nur ein Reaktionsschritt erfolgt. Dies ist in Abbildung 41 dargestellt. Für eine erfolgreiche Vernetzung von zwei Gelatinesträngen muss der Crosslinker DTT zunächst mit der Norbornengruppe eines Gelatinestranges und in einem weiteren Schritt mit der Norbornengruppe eines weiteren Gelatinestranges reagieren (Abbildung 41 A). Die Reaktion kann jedoch auch mit Norbornengruppen auf demselben Gelatinestrang stattfinden, wodurch sich ein inhomogenes Netzwerk bildet und nur eine geringe Anzahl an Thiol-En Reaktionen zur Vernetzung verschiedener Gelatinestränge führt. Für die Vernetzung von GelNB/GelS wird dagegen lediglich ein Reaktionsschritt zwischen der Thiolgruppe eines Gelatinestranges mit der Norbornengruppe eines anderen Gelatinestranges benötigt, was zur Bildung homogener Netzwerke führt (Abbildung 41 B).

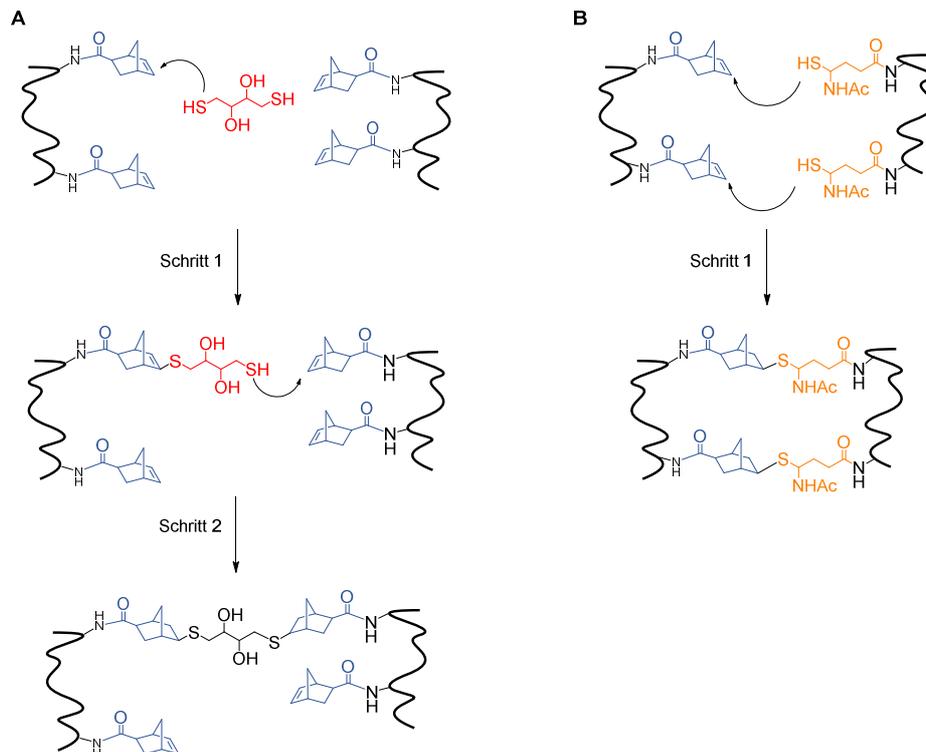


Abbildung 41: Reaktionsverlauf für die Bildung des GelNB/DTT- (A) und des GelNB/GelS-Hydrogels (B). **A:** Für eine Vernetzung der Gelatineketten reagiert der Crosslinker DTT zunächst mit einer Norbornengruppe eines Gelatinestranges und in einem nächsten Schritt mit der Norbornengruppe eines weiteren Gelatinestranges. **B:** Zur Vernetzung der Gelatineketten wird nur ein Reaktionsschritt zwischen der Thiol- und der Norbornengruppe benötigt.

Anhand dieser Resultate wurde die LAP-Konzentration für weitere Experimente für die Vernetzung von GelNB/GelS auf 0,03 % festgelegt, da diese Menge auch für geringe Volumina der Photoinitiatorlösung noch umsetzbar war. Für eine Konzentration von 0,01 % wären jeweils relativ große Ansätze der Polymerlösungen benötigt worden.

Neben dem Verzicht auf den zytotoxischen Vernetzer DTT zeigte dieser Versuch die nochmals deutlich kürzeren Aushärtungszeiten bei der Bildung des GelNB/GelS-Hydrogels auf. Dieser Effekt ist in Abbildung 42 dargestellt. Die Abbildung stellt die Zeiten bis zur sichtbaren Aushärtung der einzelnen Hydrogele GelMA-V1, GelMA-V2, GelNB/DTT und GelNB/GelS in der jeweils hoch-funktionalisierten *high*-Variante bei einer LAP-Konzentration von 0,01 % vergleichend dar. Dabei wiesen GelMA-V1 und GelMA-V2 mit Zeiten von 60 s bzw. 75 s, bedingt durch die radikalische Kettenpolymerisation, die längsten Bestrahlungsdauern auf. Bei GelNB/DTT lag die Zeit bis zur sichtbaren Aushärtung durch die zweistufige Thiol-En Reaktion bei 12 s und für GelNB/GelS durch den einstufigen Mechanismus bei 2 s. Diese deutlich kürzeren Aushärtungszeit stellte somit einen weiteren Vorteil der GelNB/GelS-Hydrogele im Vergleich zu den GelMA-Hydrogelen deutlich dar.

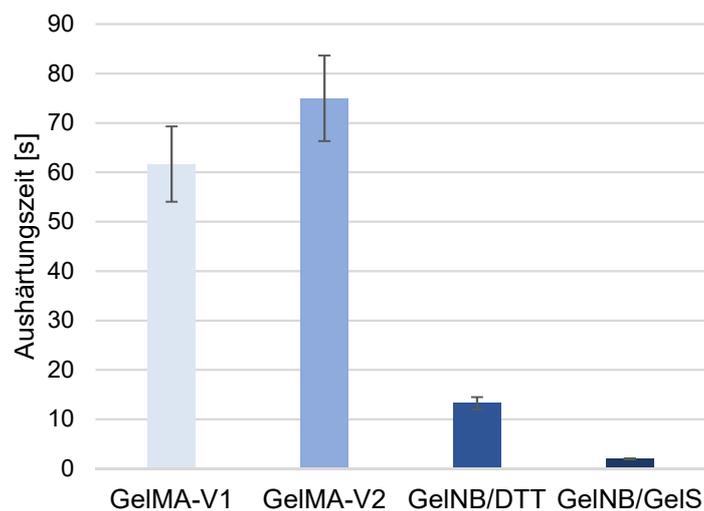


Abbildung 42: Vergleich der Aushärtungszeiten zur sichtbaren Aushärtung der verschiedenen Hydrogele GelMA-V1, GelMA-V2, GelNB/DTT und GelNB/GelS. Dargestellt sind die Zeiten für die Aushärtung der hoch-funktionalisierten *high*-Varianten der Hydrogele bei einer LAP-Konzentration von 0,01 %.

4.4 Charakterisierung der Hydrogele

Für den biologischen Einsatz der Hydrogele als sogenannte Biotinten zum Aufbau von Gewebemodellen durch 3D-Biodruckverfahren wurden zunächst, nach Bestimmung der genauen Zusammensetzung und der Bestrahlungsbedingungen, verschiedene Eigenschaften der Hydrogele untersucht. So wurde die Sterilität der Photopolymerlösungen, die Stabilität der Gele durch das Quell- und Degradationsverhalten sowie die physikalischen Eigenschaften, wie Viskosität und Festigkeit, charakterisiert.

4.4.1 Sterilität

Um Hydrogele im Bereich des *Tissue Engineering* als Stützmaterialien zum Aufbau von Geweben einzusetzen, ist es entscheidend, dass diese steril vorliegen. Sowohl beim Einsatz der Materialien in der Grundlagenforschung als auch bei der klinischen Übertragung ist diese Eigenschaft entscheidend.²³¹ Nur so ist eine Zulassung des Materials möglich, da das Risiko von Kontaminationen oder Infektionen dadurch minimiert werden kann.²³² Die Untersuchung der Sterilität der Hydrogele erfolgte in Kooperation mit Xenia Kempter (AK Schepers, Institut für Funktionelle Grenzflächen, KIT). Zur Untersuchung der Sterilität der Gelatine-basierten Hydrogele, wurden die einzelnen Photopolymere GelMA-V2, GelNB und GelS als 5 %ige Lösung angesetzt und anschließend auf Agarplatten ausplattiert. Nachdem die Platten 48 h bei 29 °C inkubiert wurden, wurde die Anzahl an Kolonien der Mikroorganismen bestimmt. Es wurden drei verschiedene Bedingungen getestet. Die Polymere wurden zum einen steril in DPBS^{-/-} und zum anderen unsteril in DPBS^{-/-} gelöst. Als Positivkontrolle dienten Photopolymere, welche durch Kontakt mit dem Fußboden gezielt verunreinigt wurden. Die Charakterisierung wurde jeweils für die hoch-funktionalisierten Varianten der Photopolymere in Triplikaten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 43 dargestellt. Fotografische Aufnahmen der Platten sind im Anhang in Abbildung 126, Abbildung 127, Abbildung 129 und Abbildung 129 dargestellt.

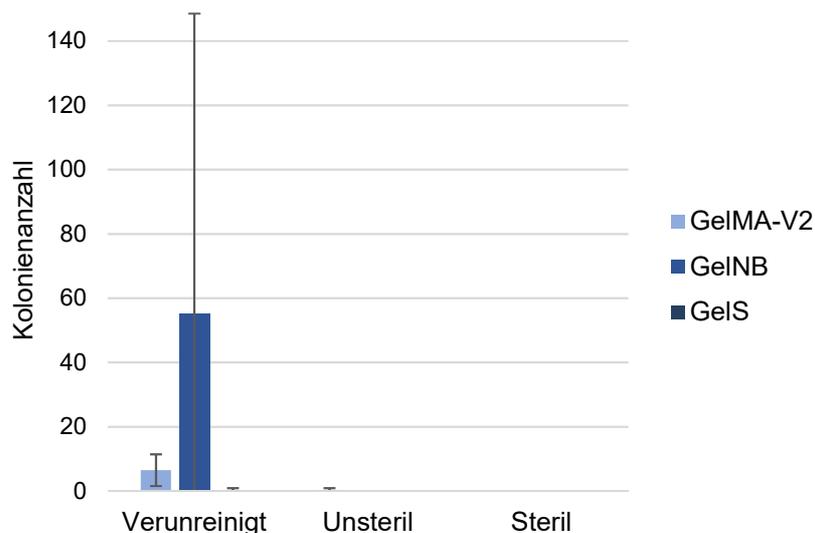


Abbildung 43: Ergebnisse der Sterilitätsuntersuchung der verschiedenen Photopolymere GelMA-V2 high, GelNB high und GelS medium. Die Photopolymere wurden steril und unsteril in DPBS^{-/-} gelöst. Als Positivkontrolle dienten jeweils gezielt verunreinigte Proben.

Deutlich zu erkennen ist die große Anzahl an Kolonien für das Photopolymer GelNB bei gezielter Verunreinigung des Materials. Die hohe Standardabweichung beruhte auf der Tatsache, dass von den Triplikaten nur eine der Platten eine sehr hohe Kolonienanzahl aufwies (siehe Abbildung 127 im Anhang). Auch die beiden Polymere GelMA-V2 und GelS wiesen nach Kon-

tamination vereinzelt Kolonien auf. Wurden die Polymere hingegen nach der Gefriertrocknung unsteril mit DPBS^{-/-} gelöst, konnte die Kolonienanzahl deutlich reduziert werden. So wies hier lediglich GelMA-V2 eine einzelne Kolonie auf der Platte auf. Um eine Verunreinigung des Lösungsmittels DPBS^{-/-} auszuschließen, wurde auch dieses auf Agarplatten aufgetragen und für 48 h inkubiert. Sowohl für unsteriles als auch für steriles DPBS^{-/-} konnten nach der Inkubationszeit keine Mikroorganismen detektiert werden (siehe Abbildung 129 im Anhang). Bei einem sterilen Lösen der Polymere unter einer biologischen Sicherheitswerkbank in DPBS^{-/-} konnte für alle untersuchten Photopolymere keine Kolonie detektiert werden. Da für das Photopolymer GelNB als Vernetzer zur Hydrogelbildung neben GelS auch DTT eingesetzt wurde, wurde dieses ebenfalls als sterile und unsterile Lösung auf Agarplatten ausplattiert. Auch hier zeigte sich jedoch für beide Bedingungen keine Kolonienbildung (siehe Abbildung 129 im Anhang). Da sich bei einem sterilen Lösen der Photopolymere in DPBS^{-/-} keine Kontamination durch Mikroorganismen detektieren ließ, wurde für die weiteren biologischen Versuche keine zusätzliche Sterilisationsmethode benötigt. Bei einem möglichen zukünftigen klinischen Einsatz der Materialien müssen diese jedoch gezielt durch verschiedene mögliche Prozesse sterilisiert werden. Dies ist jedoch besonders für Hydrogele eine große Herausforderung, da diese Materialien empfindlich auf herkömmliche Sterilisationsmethoden wie Hitze oder Bestrahlung reagieren können.²³³ Besonders das in den Hydrogelen gebundene Wasser kann dabei die Spaltung kovalenter Bindungen begünstigen und die Materialeigenschaften verändern.²³⁴ Daher muss bei einer weiteren Untersuchung geeigneter Sterilisationsmethoden für die Gelatinebasierten Hydrogele auch der Einfluss auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften überprüft werden.

4.4.2 Quelleigenschaften

Eine weitere wichtige Materialeigenschaft der Hydrogele stellt das Quellverhalten dar. Damit können die maximale Flüssigkeitsaufnahme sowie die Volumenzunahme des Hydrogels durch den Quellvorgang genauer charakterisiert werden. Diese Parameter sind unter anderem von der Funktionalisierung des Photopolymers, der Konzentration sowie dem Vernetzungsgrad abhängig.²³⁵ Hydrogele enthalten viele hydrophile Gruppen wie Carboxyl-, Amino- oder Sulfonylegruppen, die dafür verantwortlich sind, dass Hydrogele große Mengen wässriger Flüssigkeiten aufnehmen und binden können.²³⁶ Dadurch eignen sich diese Materialien zum Aufbau von artifiziellem Gewebe, da sie den Flüssigkeitsgehalt *in vivo* nachbilden können. Da verschiedene Gewebetypen unterschiedliche Flüssigkeitsgehalte aufweisen, hat die Steuerung dieser Eigenschaft eine wichtige Bedeutung bei der Materialentwicklung im Bereich des *Tissue Engineering*.^{237,238} Des Weiteren beeinflussen die Quelleigenschaften der Hydrogele auch den Stofftransport innerhalb des Gels.⁸³ Da es sich bei den entwickelten Hydrogelen um funktionalisierte Gelatine handelt, wurden auch die Quelleigenschaften von unfunktionalisierter Gelatine charakterisiert, um den Einfluss der Funktionalisierung auf die Flüssigkeitsaufnahme zu untersuchen. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit den Masterstudenten Xenia Kempter und Alisa Grimm.^{187,239} Die Charakterisierung der Quelleigenschaften wurde gravimetrisch nach

der Methode von Noshadi *et al.* in Triplikaten durchgeführt.²⁴⁰ Dabei wurden zunächst Photopolymerlösungen mit einer Konzentration von 5 % hergestellt und mit dem Photoinitiator LAP und gegebenenfalls mit dem Crosslinker DTT versetzt (siehe Kapitel 6.2.5.4). Nach der Vernetzung und Lyophilisation wurde zunächst das Trockengewicht (m_{dry}) bestimmt. Anschließend wurden die Gele bei RT in DPBS⁻ eingelegt und das Nassgewicht (m_{wet}) alle 24 h bestimmt, bis keine Gewichtsänderung mehr detektiert werden konnte. Die Flüssigkeitsaufnahme und das Quellen der Hydrogele sind in Abbildung 44 schematisch dargestellt.

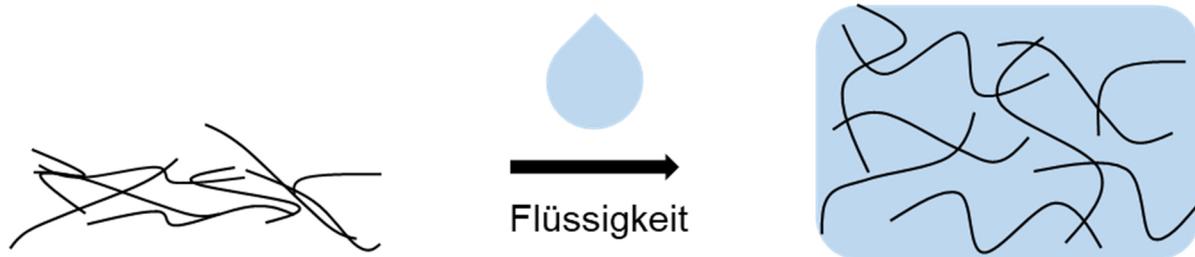


Abbildung 44: Schematische Darstellung des Quellverhaltens der Hydrogele. Durch die Einlagerung von Wassermolekülen zwischen den einzelnen Polymerketten quellen die Hydrogele auf.

Anschließend wurde der Flüssigkeitsgehalt mit Formel 2 bestimmt. Dieser gibt den Anteil der aufgenommenen Flüssigkeit an der Gesamtmasse des Hydrogels an.²⁴⁰ Das Quellverhältnis (engl.: *swelling ratio*) wurde mit Hilfe von Formel 3 bestimmt und gibt an, wie stark das Hydrogel gegenüber seinem Trockengewicht aufgequollen ist.²³⁵

$$\text{Flüssigkeitsgehalt [\%]} = \frac{m_{wet} - m_{dry}}{m_{dry}} * 100 \% \quad \text{Formel (2)}$$

$$\text{swelling ratio} = \frac{m_{wet}}{m_{dry}} \quad \text{Formel (3)}$$

Unfunktionalisierte Gelatine wurde ebenfalls in einer Konzentration von 5 % verwendet und bei 4 °C geliert. Nach der Lyophilisation wurde das Trockengewicht ermittelt und die Gelatinegele zum Quellen bei 4 °C in DPBS⁻ gelegt, um eine Denaturierung der Tripelhelices zu verhindern. Das Nassgewicht wurde alle 24 h bestimmt, bis keine Gewichtsänderung mehr detektiert werden konnte. Anschließend erfolgte die Berechnung der Quelleigenschaften mit Hilfe der Formeln 2 und 3. Die Ergebnisse der Quelleigenschaften der verschiedenen Gelatinebasierten Hydrogele sind in Abbildung 45 dargestellt.

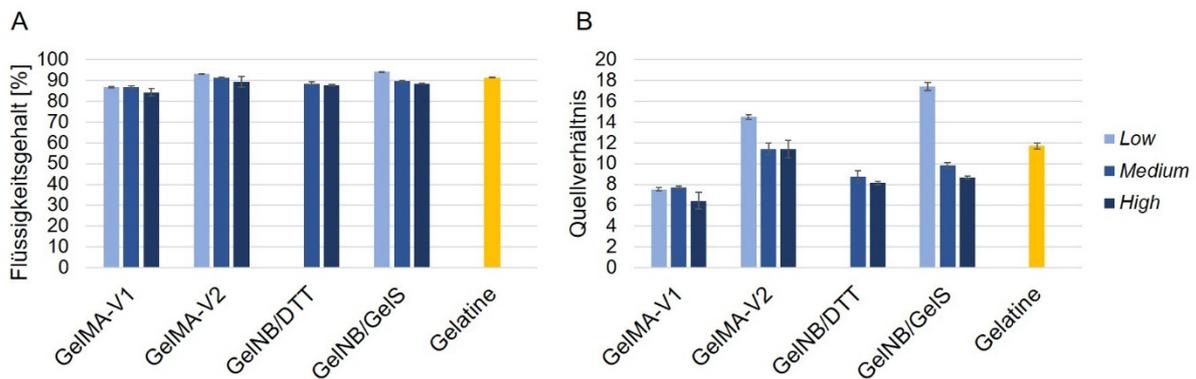


Abbildung 45: Quelleigenschaften der Hydrogele GelMA-V1, GelMA-V2, GelNB/DTT, GelNB/GelS jeweils in den Varianten *low*, *medium* und *high*, sowie von unfunktionalisierter Gelatine nach Inkubation in DPBS⁻ bei RT. **A:** Maximaler Flüssigkeitsgehalt nach 24 h bzw. 192 h für Gelatine. **B:** Quellverhältnis nach 24 h bzw. 192 h für Gelatine.

Unfunktionalisierte Gelatine wies nach 192 h einen maximalen Flüssigkeitsgehalt von 90 % auf (siehe Abbildung 45 A). Das Quellverhältnis zum Startpolymergewicht betrug für Gelatine als Reinstoff 11,6 (siehe Abbildung 45 B). Somit quoll das Gelatinegel um das 11,6-fache seines Gewichts. Um den Einfluss der Art der Funktionalisierung mit verschiedenen funktionellen Gruppen sowie des Funktionalisierungsgrades zu bestimmen, wurden auch für die semi-synthetischen Hydrogele GelMA-V1, GelMA-V2, GelNB/DTT und GelNB/GelS die Quelleigenschaften ermittelt. GelMA-V1 wies bereits nach 24 h einen maximalen Flüssigkeitsgehalt von ca. 85 % für alle drei Varianten (*low*, *medium* und *high*) auf. Ein deutlicher Unterschied zwischen den drei Varianten war nicht zu detektieren. Das Quellverhältnis im Vergleich zum Startpolymergewicht betrug für GelMA-V1 *low* 7,4. Damit war das Hydrogel um das 7,4-fache gequollen. GelMA-V1 *medium* wies ein Quellverhältnis von 7,7 und GelMA-V1 *high* eines von 6,8 auf. Damit zeigte GelMA-V1 *high* das geringste Quellverhältnis der drei GelMA-V1-Varianten auf. Dies entsprach der Erwartung, da mit zunehmendem Funktionalisierungsgrad der einzelnen Photopolymere der Grad der Vernetzung des Hydrogels zunimmt. Dadurch weisen die daraus gebildeten Hydrogele eine geringere Porengröße auf, wodurch weniger Flüssigkeit gebunden werden kann. Dass zwischen den beiden Varianten GelMA-V1 *low* und *medium* kein deutlicher Unterschied im Quellverhalten detektiert werden konnte, könnte auf den sehr nah beieinanderliegenden Funktionalisierungsgraden der beiden Photopolymere basieren. So beträgt dieser für GelMA-V1 *low* 68 % und für GelMA-V1 *medium* 81 % (siehe Kapitel 4.1.2). Im Vergleich zu unfunktionalisierter Gelatine war eine deutliche Abnahme des Quellverhältnisses zu erkennen. Die Funktionalisierung von Gelatine mit Methacrylatgruppen führt zu einer dichteren Vernetzung und somit zu geringeren Quelleigenschaften.

GelMA-V2 wies nach 24 h ebenfalls den maximalen Flüssigkeitsgehalt auf. Dieser lag für GelMA-V2 *low* bei 92 %, für *medium* bei 90 % und für *high* bei 88 %. Somit konnte eine schwache Abhängigkeit des Funktionalisierungsgrades vom maximalen Flüssigkeitsgehalt beobachtet werden. Deutlicher wurde dies bei der Ermittlung des Quellverhältnisses. GelMA-V2 *low*

quoll um das 14-fache des Polymergewichts, wohingegen GelMA-V2 *medium* und *high* lediglich um das 11-fache des eigenen Polymergewichts quollen. Im Vergleich zum Gelatine-Gel konnte eine identische Flüssigkeitsaufnahme und ein ähnliches Quellverhältnis detektiert werden. Somit konnte keine Abhängigkeit des Quellverhalten vom Funktionalisierungsgrad für GelMA-V2 festgestellt werden. Da die Herstellung von GelMA-V1 und GelMA-V2 durch die gleiche Synthese erfolgte und sich lediglich in der zugesetzten Menge des MAA unterscheiden, war ein ähnliches Verhalten von GelMA-V1 und GelMA-V2 im Vergleich zur Gelatine zu erwarten. Dieses nun detektierte unterschiedliche Verhalten könnte an der für die Synthese eingesetzten Gelatine liegen. Da es sich dabei um ein natürliches Produkt handelt, kann sich dieses in der Zusammensetzung von Charge zu Charge unterscheiden und so auch einen unterschiedlichen Einfluss auf die Quelleigenschaften der Photopolymere ausüben.

Für das Hydrogel GelNB/DTT konnten nur zwei Varianten in Bezug auf ihre Quellverhältnisse untersucht werden. GelNB/DTT *medium* und *high* wiesen nach 24 h einen maximalen Flüssigkeitsgehalt von 88 % auf. Das Quellverhältnis betrug für GelNB/DTT *medium* 8,9 und für GelNB/DTT *high* 8. Somit quollen die Hydrogele um das 8,9- bzw. 8-fache ihres Polymerstartgewichts und ein Einfluss des Funktionalisierungsgrades konnte detektiert werden. Im Vergleich zum Gelatine-Gel war das Quellverhalten, besonders das Quellverhältnis von Startpolymergewicht zu Nassgewicht, deutlich geringer. Somit konnte ein Einfluss der Funktionalisierung auf das Quellverhalten gezeigt werden.

Die GelNB/GelS-Hydrogele wiesen ebenfalls nach 24 h den maximalen Flüssigkeitsgehalt auf. GelNB/GelS *low* zeigte dabei mit 93 % den höchsten Flüssigkeitsgehalt auf. Der Gehalt von GelNB/GelS *medium* und *high* lag bei 90 % bzw. 88 %. Die Ermittlung des Quellverhältnisses lag für GelNB/GelS *low* bei 17. Somit quoll dieses Hydrogel um das 17-fache seines Polymergewichts. GelNB/GelS *medium* quoll hingegen nur um das 9,8-fache und GelNB/GelS *high* um das 8,7-fache. Somit war auch hier eine Abhängigkeit des Quellverhaltens vom Funktionalisierungsgrades erkennbar. Mit einem Quellverhältnis von 17 wies das GelNB/GelS *low*-Hydrogel das größte Quellverhalten von allen untersuchten Hydrogelen auf. Somit konnte dieses Hydrogel die größte Menge an Flüssigkeit im Inneren binden. Dies könnte auf dem niedrigen Funktionalisierungsgrad der beiden Photopolymere GelNB und GelS beruhen. Durch deren Vernetzung bildet sich ein Hydrogel mit großen Poren aus, in denen Flüssigkeit gebunden und gespeichert werden kann.

Beim Vergleich des Quellverhaltens aller untersuchten Hydrogele konnte eine Abhängigkeit der Quelleigenschaften vom Funktionalisierungsgrad der Photopolymere detektiert werden. Je höher der Funktionalisierungsgrad, desto enger und steifer ist das entstehende Polymernetzwerk nach der Vernetzung. Durch die kleineren Poren kann weniger Flüssigkeit innerhalb der Netzwerkstruktur aufgenommen und gespeichert werden. Alle untersuchten Hydrogele wiesen mit 80 % bis 90 % einen ähnlichen Flüssigkeitsgehalt wie die unfunktionalisierten Gelatine-Gele auf. Durch die Variation des Funktionalisierungsgrades und die dadurch entstehenden,

unterschiedlich engen Polymernetzwerke konnte gezeigt werden, dass sich die Quelleigenschaften unterschiedlich beeinflussen lassen und sich somit zum Aufbau von verschiedenen artifiziellen Gewebetypen eignen.

4.4.3 Degradationsverhalten

Die Stabilität und Bioabbaubarkeit von Materialien sind im Bereich des *Tissue Engineering* von großer Bedeutung. Bei Materialien, die zum Aufbau von artifiziellm Gewebe eingesetzt werden sollen, ist Stabilität bei gleichzeitiger Bioabbaubarkeit nötig. Solche Gewebe sollten über einen gewissen Zeitraum stabil bleiben, aber den darin enthaltenen Zellen gleichzeitig die Degradation des Materials für Proliferation, Netzbildung, Morphogenese oder Signaltransduktion, erlauben.^{241,242} Da es sich bei den verwendeten Hydrogelen um Gelatine-basierte semi-synthetische Hydrogele handelt, weisen diese Protease-sensitive Schnittstellen (Matrix-Metalloproteasen-Schnittstellen, MMP) im Gelatine-Rückgrat auf.²⁴³ Um diese Bioabbaubarkeit näher zu charakterisieren, wurde in einem nächsten Schritt das enzymatische Degradationsverhalten der Hydrogele GelMA-V1, GelMA-V2, GelNB/DTT und GelNB/GelS über einen Zeitraum von 14 Tagen in zwei verschiedenen Medien untersucht. Zum einen in DPBS⁻ mit 10 % FCS, zum anderen in dem Zellkultivierungsmedium DMEM (10 % FCS, 1 % P/S). Die Charakterisierung des Degradationsverhalten wurde in Zusammenarbeit mit der Masterstudentin Alisa Grimm durchgeführt und erfolgte gravimetrisch in Triplikaten nach der Methode von Noshadi *et al.*^{239,240} Dazu wurden zunächst Photopolymerlösungen in einer Konzentration von 5 % in den beiden Medien DPBS⁻/FCS und DMEM hergestellt und mit LAP und gegebenenfalls dem Crosslinker DTT versetzt (genaue Zusammensetzung der Hydrogele siehe Kapitel 6.2.5.4). Jeweils 200 µl der Lösungen wurden unter der Aushärtungslampe Omnicure S2000 zum Hydrogel vernetzt. Nach anschließender Lyophilisation wurde das Trockengewicht (m_{t0}) mit Hilfe einer Feinwaage ermittelt und die Hydrogele in den Degradationsmedien bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zu den Messzeitpunkten Tag 1, Tag 2, Tag 3, Tag 4, Tag 7 und Tag 14 wurden die Hydrogele entnommen und nochmals lyophilisiert. Das Trockengewicht (m_t) der Gele wurde erneut mit einer Feinwaage ermittelt und das prozentual verbleibende Gewicht mit Hilfe von Formel 4 ermittelt.

$$\text{Verbleibendes Gewicht [\%]} = \frac{m_{t0}}{m_t} * 100 \% \quad \text{Formel (4)}$$

Die Ergebnisse der Charakterisierung des Degradationsverhaltens für die Hydrogele GelMA-V1, GelMA-V2, GelNB/DTT und GelNB/GelS sind in Abbildung 46 dargestellt.

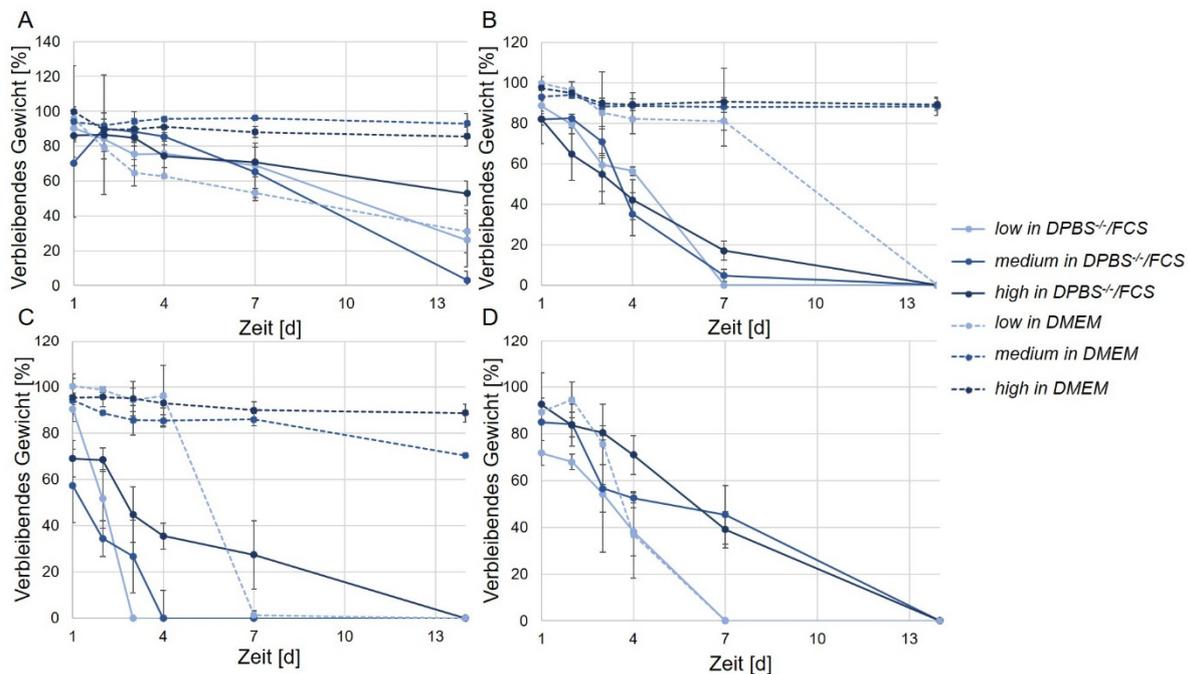


Abbildung 46: Degradationsverhalten der Hydrogele GelMA-V1, GelMA-V2, GelNB/DDT und GelNB/GelS jeweils in den drei Varianten *low*, *medium* und *high* über einen Zeitraum von 14 Tagen. Durchgezogene Linien stellen das Degradationsverhalten in DPBS-/FCS dar, unterbrochene Linien stellen das Degradationsverhalten in DMEM dar. **A:** GelMA-V1, **B:** GelMA-V2, **C:** GelNB/DDT, **D:** GelNB/GelS. Erstellt in Kollaboration mit T. Göckler.¹⁸⁶

In Abbildung 46 A sind die Ergebnisse für die GelMA-V1-Hydrogele in den Varianten *low*, *medium* und *high* dargestellt. Beim enzymatischen Abbau durch DPBS⁻/FCS lagen nach 7 Tagen noch ca. 70 % der drei Hydrogelvarianten vor. Nach 14 Tagen war das *medium*-Hydrogel fast vollständig abgebaut, wohingegen die *high*-Variante noch bei 50 % des Startgewichts lag. Das *low*-Hydrogel wies nach 14 Tagen noch ca. 30 % des Startpolymergewichts auf. Die Degradation der GelMA-V1-Hydrogele erfolgte in DMEM deutlich langsamer. So lag das Trockengewicht nach 14 Tagen für *medium* und *high* noch bei über 80 %. Lediglich das *low*-Hydrogel wies über den untersuchten Zeitraum eine kontinuierliche Degradation bis ca. 30 % auf. Somit konnte eine Abhängigkeit der Abbaugeschwindigkeit vom Funktionalisierungsgrad und der Netzwerkstruktur des Hydrogels detektiert werden. Obwohl auch das Medium DMEM mit 10 % FCS versetzt wurde, geschah der enzymatische Abbau der Hydrogele deutlich langsamer. Dieser Effekt konnte ebenfalls bei den GelMA-V2-Hydrogelen detektiert werden (siehe Abbildung 46 B). In DMEM wiesen das *medium*- und *high*-Hydrogel auch nach 14-tägiger Inkubationszeit noch ein Trockengewicht von über 80 % auf. Lediglich die *low*-Variante war nach 14 Tagen komplett degradiert. In DPBS⁻/FCS erfolgte ein rascher Abbau. Bereits nach 7 Tagen waren die *low* und *medium* Gele komplett abgebaut. Nach 14 Tagen war auch das GelMA-V2 *high*-Hydrogel abgebaut. Durch die vorhandenen MMP-Schnittstellen im Rückgrat der Gelatine wurde dieses durch die im FCS enthaltenen Enzyme immer weiter fragmentiert, bis das

Hydrogel keine zusammenhängende Struktur mehr besaß und sich schließlich komplett im Degradationsmedium auflöste.

Das GelNB/DTT-Hydrogel zeigte ein stärkeres Degradationsverhalten im Vergleich zu den GelMA-V1- und GelMA-V2-Hydrogelen (siehe Abbildung 46 C). So war das GelNB/DTT *low*-Hydrogel bereits nach 3 Tagen in DPBS/FCS abgebaut, das *medium*-Gel nach 4 Tagen und *high* nach 14 Tagen. In DMEM wiesen GelNB/DTT *medium* und GelNB/DTT *high*, ähnlich wie die GelMA-Hydrogele, eine große Stabilität über den getesteten Zeitraum auf. Nach 14 Tagen lag das Trockengewicht noch bei über 70 %. Auch für die GelNB/DTT-Hydrogele konnte eine Abhängigkeit der Degradation vom Funktionalisierungsgrad der Photopolymere und damit der Netzwerkstruktur der vernetzten Hydrogele detektiert werden.

Das Degradationsverhalten des GelNB/GelS-Hydrogels in allen drei Varianten konnte aufgrund schlechter Löslichkeit in DMEM nur in DPBS⁻/FCS komplett analysiert werden. So zeigte sich für *low* eine Degradation des Gels über einen Zeitraum von 7 Tagen (siehe Abbildung 46 D). GelNB/GelS *medium* und *high* wiesen eine größere Stabilität auf. Nach 7 Tagen war noch über 40 % des Startpolymergewichts vorhanden. Nach 14 Tagen waren die beiden Hydrogele jedoch auch vollständig abgebaut. Aufgrund der schlechten Löslichkeit des GelS Photopolymers in DMEM konnte für dieses Degradationsmedium lediglich der Abbau von GelNB/GelS *low* untersucht werden. Ähnlich wie bei DPBS/FCS erfolgte auch hier eine kontinuierliche Degradation über einen Zeitraum von 7 Tagen. Somit war auch bei diesem Hydrogel die Abhängigkeit der Abbaugeschwindigkeit vom Funktionalisierungsgrad der Photopolymere und damit der Netzwerkstruktur der Hydrogele detektierbar. Bei einem geringeren Funktionalisierungsgrad bildet sich bei der Vernetzung ein flexibles Netzwerk mit großen Poren und weniger Vernetzungen als bei einem höheren Funktionalisierungsgrad aus. Dadurch lässt sich die erhöhte Abbaugeschwindigkeit der *low*-Varianten in allen untersuchten Hydrogelen erklären. Durch die größeren Poren können diese Hydrogele mehr Flüssigkeit im Inneren der Gele binden und speichern, und auch die Diffusionsgeschwindigkeit für Stoffe innerhalb der Polymerstruktur erhöht sich. Dadurch gelangen auch mehr Enzyme ins Innere der Strukturen und können diese nicht nur von außen, sondern auch von innen heraus degradieren. Dass sich die Degradationsgeschwindigkeiten zwischen den beiden Medien DPBS⁻/FCS und DMEM, zu welchem auch 10 % FCS zugesetzt wurden, unterschieden, könnte am zusätzlichen Vorhandensein von Proteinen und Nährstoffen im Zellkultivierungsmedium DMEM sein. Dadurch könnten die im FCS enthaltenen Enzyme in ihrer Aktivität vermindert gewesen sein. Bei Vergleich der Stabilität und Abbaugeschwindigkeit aller Hydrogele, ließ sich GelMA-V1 als das stabilste Hydrogel detektieren. Die geringste Stabilität wies das GelNB/DTT-Hydrogel auf. Bereits nach vier Tagen waren die *low*- und *medium*-Variante des Hydrogels komplett degradiert. Das GelNB/GelS-Hydrogel wies für die Varianten *medium* und *high* auch eine große Stabilität über einen Zeitraum von sieben Tagen auf. GelNB/GelS *low* wies dagegen eine erhöhte Bioabbaubarkeit auf. Dadurch zeigte sich, dass sich die Degradationseigenschaften unterschiedlich einstellen lassen und sich die Gele so für Anwendungsgebiete, welche erhöhte Stabilität erfordern, einsetzen lassen, aber auch für solche, die eine erhöhte Bioabbaubarkeit erfordern.

4.4.4 Rheologische Charakterisierung der Polymerlösungen

Da die Gelatine-basierten Hydrogele auch als Biotinten für den 3D-Biodruck verwendet werden sollten, wurden in einem nächsten Schritt die rheologischen Eigenschaften der nicht-vernetzten Photopolymerlösungen in Kooperation mit Bruna Regina Maciel (Arbeitsgruppe Angewandte Mechanik, Institut für Mechanische Verfahrenstechnik, KIT) genauer charakterisiert. Dabei wurde die Scherviskosität der Polymerlösungen untersucht, um deren Eignung für Extrusionsdruckprozesse sowie die viskoelastischen Eigenschaften (Schermodule) der nicht-vernetzten Lösungen bei verschiedenen Temperaturen zu evaluieren. Für diese Analysen wurde ein Platte-Platte-Rheometer verwendet. Für die Analyse der Proben wird das zu untersuchende Material zunächst auf einem flachen Probenteller aufgebracht und durch eine zweite Platte in einem bestimmten Messabstand (d) fixiert (siehe Abbildung 47 B). Bei der Messung rotiert die obere Platte dann mit einer zuvor festgelegten Kraft oder Geschwindigkeit, wodurch das Fließverhalten und die Deformation der Probe bestimmt werden können.²⁴⁴

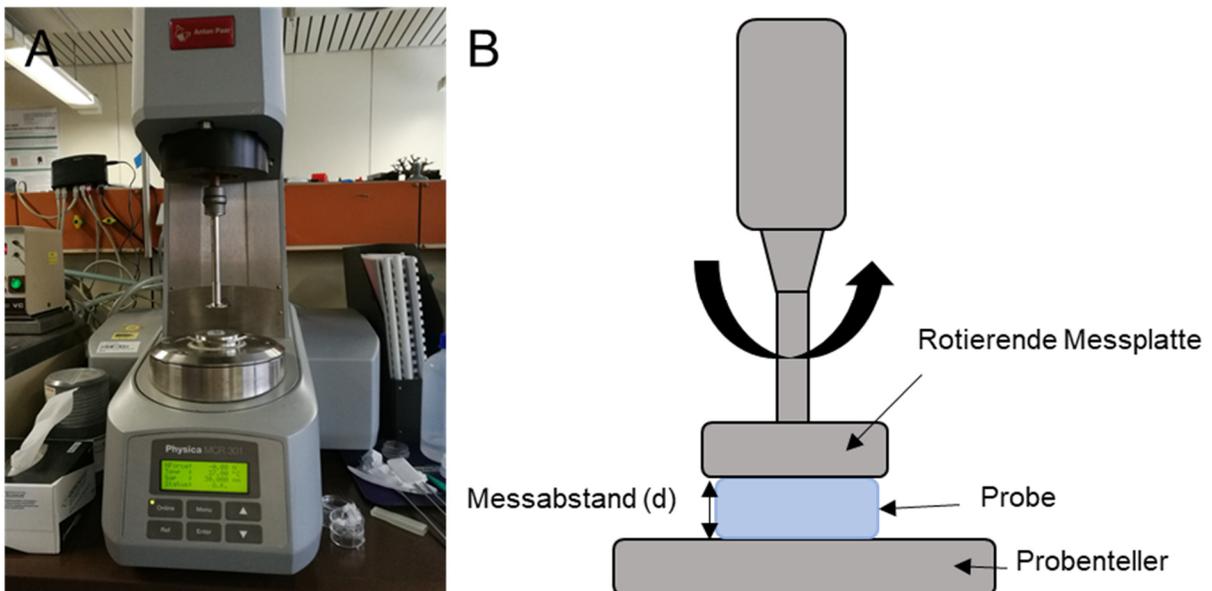


Abbildung 47: Platte-Platte-Rheometer zur Untersuchung der physikalischen Eigenschaften von Materialien. **A:** Platte-Platte-Rheometer der Firma Anton Paar GmbH. **B:** Schematische Darstellung des Messsystems.

4.4.4.1 GelMA-V1

Um die Viskositätsprofile der GelMA-V1 Photopolymerlösungen zu charakterisieren wurde die Viskosität der nicht-vernetzten 5 %igen Polymerlösungen sowohl bei 37 °C als auch bei 14 °C mit Hilfe eines Platte-Platte-Rheometers (Physica MCR 501, Anton Paar GmbH) und einer Rotationsmessung über einen Scherratenbereich von 1-1000 s⁻¹ untersucht. Die Ergebnisse sind Abbildung 48 A und Abbildung 48 B dargestellt. Bei 37 °C (Abbildung 48 A) zeigten die drei Photopolymerlösungen ein deutlich flüssiges Verhalten auf, welches dem eines newtonschen Fluids stark ähnelte. Dies bedeutet, dass keine signifikante Abhängigkeit der Viskosität der Lösungen von der Scherrate vorlag. Die gemessene Viskosität von etwa 8 mPa·s blieb über weite Bereiche der Messung konstant. Da die drei Lösungen bei 37 °C eine sehr geringe Viskosität aufwiesen eigneten sie sich bei dieser Temperatur nicht für 3D Druckprozesse. Ein weit verbreiteter Ansatz dieses Problem zu umgehen, ist die Abkühlung der Polymerlösungen.²⁴⁵ Durch den Abkühlprozess findet eine natürliche Gelierung der Kollagenhelices in der Gelatine statt. Diese lagern sich dann zu stabilen Tripelhelices zusammen und verfestigen die Polymerlösungen. Deshalb wurde die Scherviskosität der drei Lösungen zusätzlich bei 14 °C bestimmt und lag damit deutlich unter dem Gelierungspunkt von Gelatine.²⁴⁶ Das Viskositätsprofil der drei Lösungen bei 14 °C ist in Abbildung 48 B dargestellt. Hier wiesen die drei Polymerlösungen eine signifikante Abhängigkeit der Viskosität von der Scherrate auf. Diese reichte von 10 kPa·s für Scherraten von 0,1 s⁻¹ bis 0,8 Pa·s für hohe Scherraten von 1000 s⁻¹. Dieses scherverdünnende Verhalten ist eine wichtige Eigenschaft für die Anwendung der Photopolymerlösungen als Biotinten. Da sie sich bei hohen Scherraten verflüssigen, eignen sie sich dazu, durch kleine Nadelöffnungen extrudiert zu werden. Dies wirkt sich positiv auf eventuell in der Biotinte enthaltene Zellen aus, da die auf die Zellen wirkenden Scherkräfte durch ein Verflüssigen der Biotinte reduziert werden. Verringert sich die Scherrate, so nimmt die Viskosität der Lösung sofort wieder zu und stellt die Stabilität der gedruckten Struktur sicher.

Zusätzlich wurden auch die Schermodule der drei Polymerlösungen bei 14 °C charakterisiert, um einen Einfluss der Funktionalisierung der Lysinseitenketten der Gelatine auf den temperaturabhängigen Gelierungsprozess zu untersuchen. Dafür wurde ebenfalls ein Platte-Platte Rheometer (Physica MCR 501, Anton Paar GmbH) verwendet. Die Messung der Speichermodule und Verlustmodule erfolgte mit Hilfe einer Oszillationsmessung mit einer konstanten Amplitude von 1 Pa über einen Frequenzbereich von 0,1-100 rad/s. Die Ergebnisse sind in Abbildung 48 C dargestellt. Die Verlustmodule G'' geben dabei die durch den Scherprozess verlorene Deformationsenergie an und repräsentieren das viskose Verhalten der Lösungen. Die Speichermodule G' geben die gespeicherte Deformationsenergie der Proben an und repräsentieren das elastische Verhalten.²⁴⁷ Die Speichermodule G' der drei Lösungen blieben über die gesamte Messdauer konstant und lagen deutlich höher als die Verlustmodule G'' der drei Lösungen. Dadurch bestätigte sich die vollständige Gelierung zum Gel bei 14 °C, da sich die drei Photopolymerlösungen hier wie ein Feststoff verhielten (G' > G''). In Abbildung 48 D sind die Plateau-Speichermodule der drei GelMA-V1-Lösungen bei 14 °C dargestellt. Low wies

ein Speichermodul von ca. 1000 Pa auf, *medium* wies das größte Speichermodul mit 1600 Pa auf und *high* eines von 950 Pa auf. Somit zeigte die physikalisch gelierte *medium*-Lösung die größte Festigkeit der drei Varianten auf. Ein Einfluss des Funktionalisierungsgrades auf die temperaturabhängige Gelierung der Kollagenhelices konnte hier nicht detektiert werden. Bei allen drei Varianten war eine Gelierung festzustellen, wobei *medium* die größte Festigkeit aufwies. Es wäre zu erwarten gewesen, dass sich die Methacrylamidgruppen der modifizierten Photopolymere negativ auf den temperaturabhängigen Gelierungsprozess der Gelatine auswirken, da sie die Zusammenlagerung einzelner Tripelhelices erschweren könnten. Dieser Effekt konnte jedoch für die GelMA-V1-Lösungen nicht detektiert werden, da die *medium*-Variante, trotz vermehrter Methacrylamidgruppen, im Vergleich zu der *low*-Variante die größte Festigkeit aufwies. Zusätzlich wurden die Schermodule der drei Lösungen auch bei 37 °C bestimmt. Dabei lagen die Verlustmodule G'' über den Speichermodulen G' , wodurch das flüssige Verhalten der Lösungen bei 37 °C bestätigt wurde. Die Ergebnisse sind im Anhang in Abbildung 130 A dargestellt.

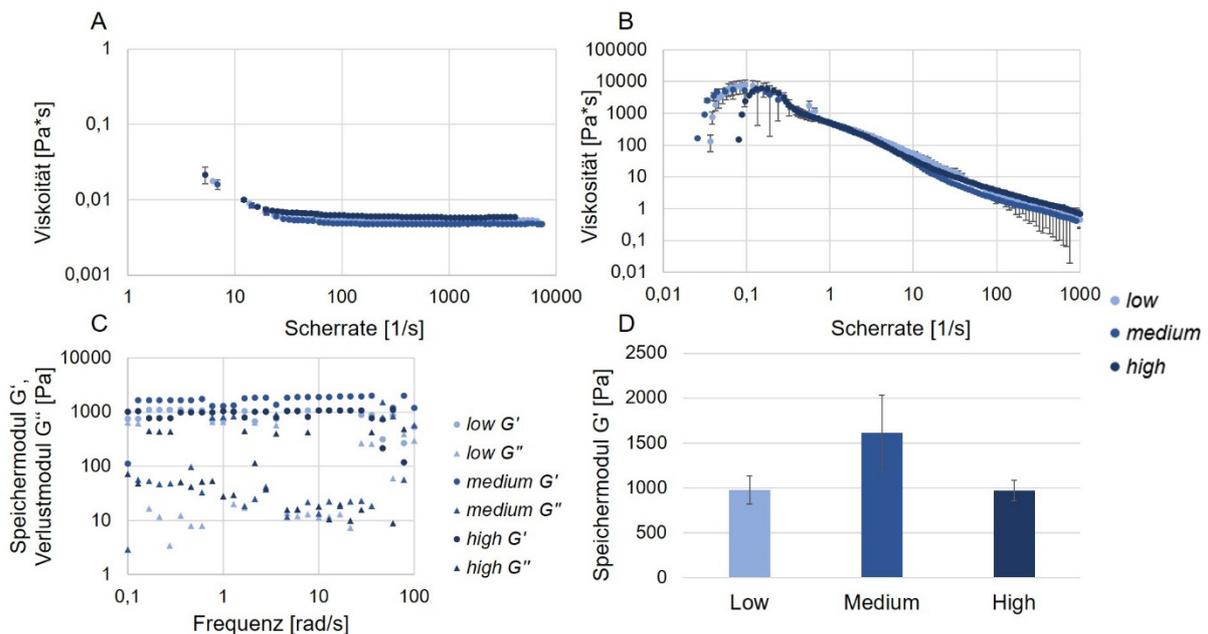


Abbildung 48: Rheologische Eigenschaften der nicht-vernetzten 5%igen GelMA-V1-Polymerlösungen. **A:** Scherviskosität der drei Photopolymerlösungen *low*, *medium* und *high* bei 37 °C. **B:** Scherviskosität der drei Photopolymerlösungen *low*, *medium* und *high* bei 14 °C. **C:** Daten des Frequenzdurchlaufs (Speichermodul G' , Verlustmodul G'') für die drei Photopolymerlösungen bei 14 °C. **D:** Plateau-Speichermodul G' der drei nicht-vernetzten Polymerlösungen bei 14 °C.

4.4.4.2 GelMA-V2 und Gelatine

Auch für GelMA-V2 wurden die Viskositätsprofile der 5%igen Lösungen bei 37 °C und bei 14 °C mit Hilfe eines Platte-Platte Rheometers (Physica MCR 501, Anton Paar) und einer Rotationsmessung über einen Scherratenbereich von 1-10000 s⁻¹ bestimmt. Um zu detektieren,

ob sich Gelatine als Reinstoff ähnlich wie die funktionalisierten Photopolymere verhält, wurden die Versuche auch für eine 5%ige Gelatinelösung durchgeführt. Das Viskositätsprofil der drei nicht-vernetzten GelMA-V2-Lösungen und das von Gelatine sind in Abbildung 49 A dargestellt. Für alle drei Polymerlösungen und für Gelatine zeigte sich das identische Verhalten. Es war keine Abhängigkeit der Viskosität von der Scherrate zu beobachten. Alle Lösungen verhielten sich wie ein newtonsches Fluid und waren deshalb bei dieser Temperatur nicht für Extrusionsdruckprozesse einsetzbar. Die Viskositätsprofile der Lösungen bei nach der temperaturabhängigen Gelierung der Kollagenhelices der Gelatine sind in Abbildung 49 B dargestellt. Alle drei GelMA-V2-Lösungen, sowie Gelatine, wiesen hier scherverdünnende Eigenschaften auf. Die Viskosität lag für geringe Scherraten bei über 1000 Pa·s und sank kontinuierlich mit zunehmender Scherrate. Bei einer Scherrate von 1000 s⁻¹ lag die Viskosität für die Lösungen zwischen 0,1 und 1 Pa·s. Somit konnte auch für das Photopolymer GelMA-V2 und Gelatine als Reinstoff die Eignung als scherverdünnende Biotinte für Extrusionsdruckprozesse bestätigt werden. Um den Einfluss der Funktionalisierung der Lysinseitenketten mit den Methacrylamidgruppen auf den temperaturabhängigen Gelierungsprozess der Kollagenhelices zu untersuchen wurden die Schermodule und damit auch die Festigkeit der drei nicht-vernetzten GelMA-V2 Lösungen bei 14 °C näher charakterisiert. Dafür wurde ebenfalls ein Platte-Platte Rheometer (Physica MCR 501, Anton Paar GmbH) verwendet. Die Messung der Speichermodule und Verlustmodule erfolgte mit Hilfe einer Oszillationsmessung mit einer konstanten Amplitude von 1 Pa über einen Frequenzbereich von 0,1-100 rad/s. Die Ergebnisse sind in Abbildung 49 B dargestellt. Die Speichermodule G' lagen für alle untersuchten Lösungen höher als die Verlustmodule G'', wodurch das viskoelastische Feststoffverhalten der Lösungen bei 14 °C bestätigt wurde. Für einen genaueren Vergleich der Festigkeiten der drei GelMA-V2-Lösungen untereinander und mit Gelatine wurden aus den Speichermodule G' der einzelnen Polymerlösungen die Plateau-Speichermodule ermittelt. Diese sind in Abbildung 49 D dargestellt. So lagen die G'-Werte für Gelatine, GelMA-V2 *medium* und *high* bei ca. 1000 Pa. GelMA-V2 *low* wies das größte Speichermodul mit 1200 Pa auf. Eine Abhängigkeit des Funktionalisierungsgrades von der temperaturabhängigen Gelierung konnte im Vergleich zu unfunktionalisierter Gelatine nicht detektiert werden, da auch die hoch-funktionalisierten Photopolymere GelMA-V2 *medium* und *high* ein identisches Speichermodul wie unfunktionalisierte Gelatine aufwiesen. Zusätzlich wurden die Schermodule der drei Photopolymerlösungen und der Gelatinelösung auch bei 37 °C bestimmt. Dabei lagen die Verlustmodule G'' über den Speichermodule G', wodurch das flüssige Verhalten der Lösungen bei 37 °C nochmals bestätigt wurde. Die Ergebnisse sind im Anhang in Abbildung 130 B dargestellt.

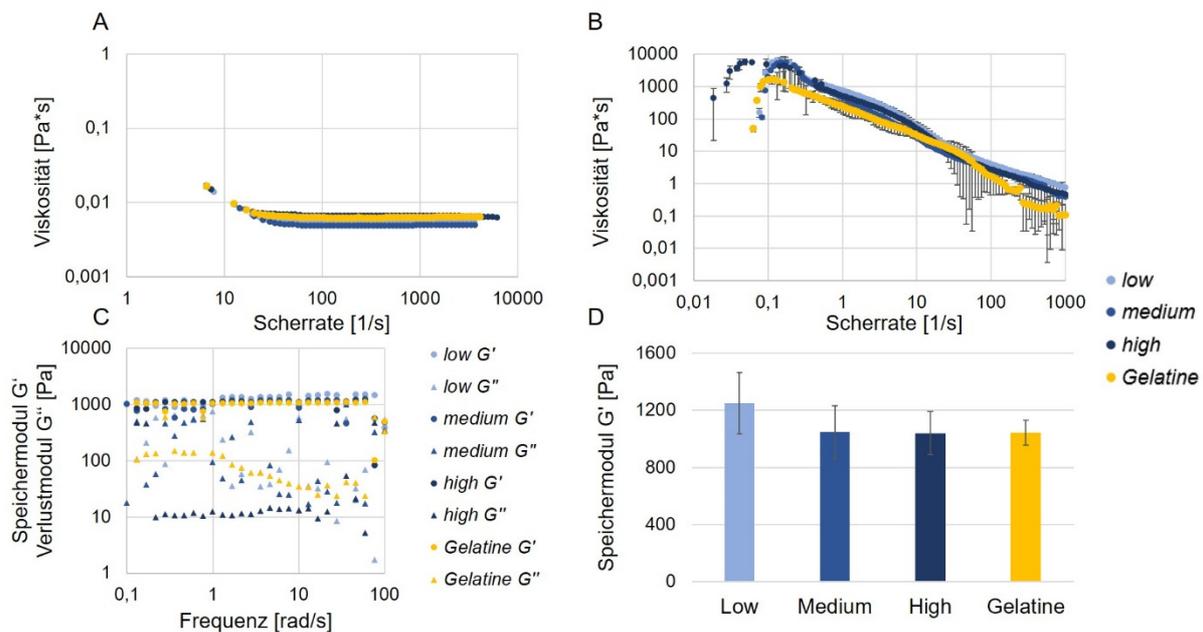


Abbildung 49: Rheologische Eigenschaften der nicht-vernetzten 5%igen GelMA-V2-Polymerlösungen und des Reinstoffs Gelatine. **A:** Scherviskosität der drei Photopolymerlösungen low, medium und high und der Gelatine bei 37 °C. **B:** Scherviskosität der drei Photopolymerlösungen low, medium und high und der Gelatine bei 14 °C. **C:** Daten des Frequenzdurchlaufs (Speichermodule G' , Verlustmodule G'') für die drei Photopolymerlösungen und Gelatine bei 14 °C. **D:** Plateau-Speichermodule G' der drei nicht-vernetzten Polymerlösungen und der Gelatine bei 14 °C.

4.4.4.3 GeINB/DTT

Auch für GeINB/DTT wurden die Viskositätsprofile der 5%igen Polymerlösungen bei 37 °C und bei 14 °C mit Hilfe eines Platte-Platte Rheometers (Physica MCR 501, Anton Paar) und einer Rotationsmessung über einen Scherratenbereich von 1-10000 s^{-1} bestimmt. Das Viskositätsprofil bei 37 °C ist in Abbildung 50 A dargestellt. Dabei wiesen alle drei nicht-vernetzten Photopolymerlösungen ein flüssiges Verhalten auf. Eine Abnahme der Viskosität mit zunehmender Scherrate konnte nicht detektiert werden. So lag diese für GeINB/DTT *low* und *high* bei ca. 0,01 Pa·s und blieb über den Messbereich weitestgehend konstant. GeINB/DTT *medium* wies Viskositätswerte unter 0,001 Pa auf. Da sich die nicht-vernetzten Lösungen bei 37 °C wie ein newtonsches Fluid verhielten, eigneten sie sich bei dieser Temperatur nicht für Extrusionsdruckprozesse. Wurden die Lösungen jedoch auf 14 °C abgekühlt, wiesen sie ein pseudoplastisches Verhalten auf. Dies ist in Abbildung 50 B dargestellt. Bei geringen Scherraten von 0,1 s^{-1} wiesen die drei nicht-vernetzten Lösungen Viskositätswerte von 5000 Pa·s auf. Mit zunehmender Scherrate sanken auch die Viskositätswerte. Bei einer Scherrate von 100 s^{-1} lagen die Viskositätswerte bei unter 10 Pa·s. Dieses scherverdünnende Verhalten wirkt sich positiv auf Extrusionsdruckprozesse aus, da es eine Extrusion der viskosen Biotinten durch eine kleine Nadelöffnung erlaubt und gleichzeitig der gedruckten Struktur Formstabilität verleiht, da die Viskosität unmittelbar nach der Extrusion wieder zunimmt. Um einen Einfluss der Norbornen-

Funktionalisierung auf den temperaturabhängigen Gelierungsprozess der Gelatine zu untersuchen, wurden die Schermodule der drei Lösungen bei 14 °C mit Hilfe eines Oszillationsversuches mit konstanter Amplitude von 1 Pa über einen Frequenzbereich von 0,1-100 rad/s ermittelt. Dieser Frequenzverlauf ist in Abbildung 50 C dargestellt. Die Speichermodule G' lagen für alle drei GeINB/DTT-Varianten deutlich über den Werten der Verlustmodule G'' , wodurch die Gelierung bei 14 °C zum festen Gel bestätigt wurde.

Um die drei Varianten untereinander besser zu Vergleichen, wurden die Plateau-Speichermodule G' ermittelt und in Abbildung 50 D aufgetragen. Die Speichermodule G' für die einzelnen Varianten betragen 350 Pa für *low*, 400 Pa für *medium* und 420 Pa für *high*. Diese lagen somit in einem sehr ähnlichen Bereich und deutlich unterhalb des Wertes für unfunktionalisierte Gelatine (1000 Pa, siehe Abbildung 49 D). Die Funktionalisierung der Lysinseitenketten der Gelatine mit Norbornengruppen könnte sich auf den Gelierungsprozess der Gelatine auswirken. Die Norbornengruppen könnten das Zusammenlagern der einzelnen Kollagenhelices zu Tripelhelices durch ihre Größe sterisch hindern, sodass eine temperaturabhängige Gelierung nicht zwischen allen Helices stattfinden kann. Zusätzlich wurden die Schermodule der drei Photopolymerlösungen auch bei 37 °C bestimmt. Dabei lagen die Verlustmodule G'' über den Speichermodulen G' , wodurch das flüssige Verhalten der Lösungen bei 37 °C nochmals bestätigt wurde. Die Ergebnisse sind im Anhang in Abbildung 130 C dargestellt.

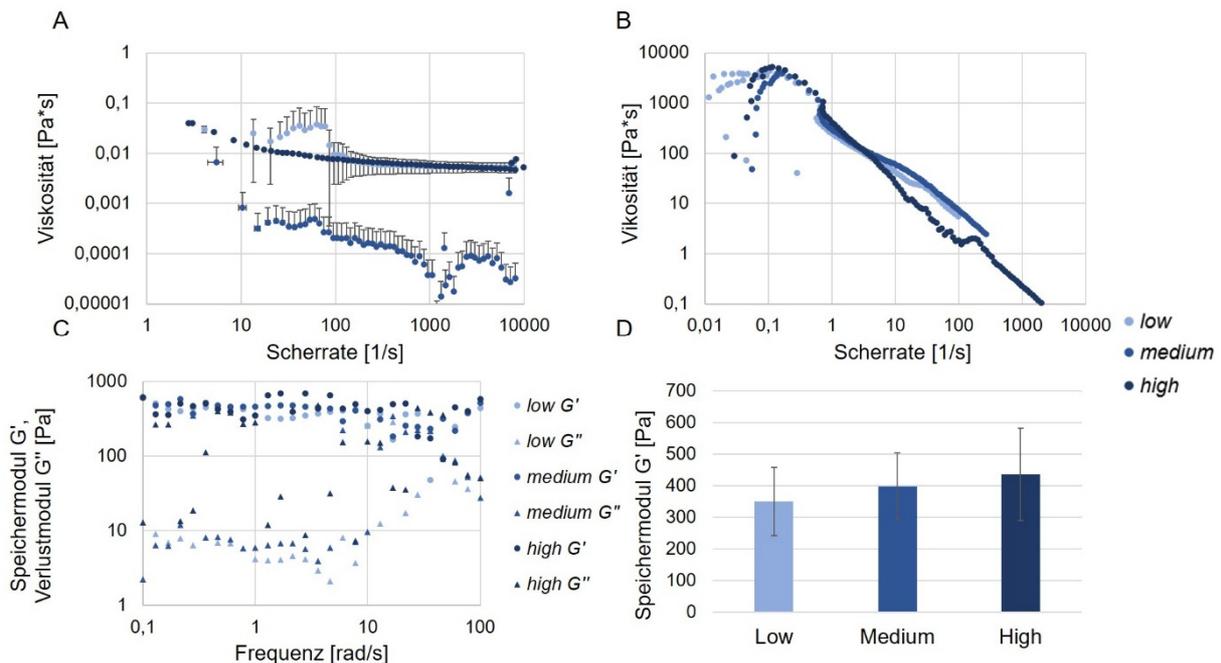


Abbildung 50: Rheologische Eigenschaften der nicht-vernetzten 5%igen GeINB/DTT-Polymerlösungen. **A:** Scherviskosität der drei Photopolymerlösungen *low*, *medium* und *high* bei 37 °C. **B:** Scherviskosität der drei Photopolymerlösungen *low*, *medium* und *high* bei 14 °C. **C:** Daten des Frequenzdurchlaufs (Speichermodule G' , Verlustmodule G'') für die drei Photopolymerlösungen bei 14 °C. **D:** Plateau-Speichermodule G' der drei nicht-vernetzten Polymerlösungen bei 14 °C.

4.4.4.4 GeINB/GeIS

Um die Viskositätsprofile der GeINB/GeIS-Photopolymerlösungen zu charakterisieren wurde die Viskosität der nicht-vernetzten 5%igen Polymerlösungen sowohl bei 37 °C als auch bei 14 °C mit Hilfe eines Platte-Platte-Rheometers (Physica MCR 501, Anton Paar GmbH) und einer Rotationsmessung über einen Scherratenbereich von 1-10000 s⁻¹ untersucht. Das Viskositätsprofil der drei Lösungen *low*, *medium* und *high* bei 37 °C ist in Abbildung 51 A dargestellt. Die Polymerlösungen wiesen dasselbe Verhalten auf wie die zuvor untersuchten Photopolymerlösungen: Ein flüssiges Verhalten, welches dem eines newtonschen Fluids stark ähnelte, da keine Abhängigkeit der Viskosität von der Scherrate detektiert werden konnte. Die Viskosität blieb für alle drei Lösungen über den kompletten Scherratenbereich konstant unter 0,01 Pa·s. Daher eigneten sich die Lösungen bei dieser Temperatur nicht als Biotinten, da sie keine Formstabilität aufwiesen. Bei Abkühlen der Lösungen auf 14 °C lagern sich die in den Lösungen enthaltenen Kollagenhelices zu stabilen Tripelhelices zusammen und verfestigen die nicht-vernetzte Photopolymerlösung physikalisch. Die Viskositätsprofile der Lösungen bei dieser Temperatur sind in Abbildung 51 B dargestellt. Hier wiesen die drei Polymerlösungen eine signifikante Abhängigkeit der Viskosität von der Scherrate auf. Diese reichte von 10 kPa·s für Scherraten von 0,1 s⁻¹ bis 0,9 Pa·s für hohe Scherraten von 1000 s⁻¹. Da sie ein schererdünnendes Verhalten aufzeigten, eigneten sich auch die GeINB/GeIS Photopolymerlösungen als Biotinten für extrusionsbasierte Biodruckprozesse. Um eine Abhängigkeit der Norbornen-Funktionalisierung von der temperaturabhängigen Gelierung der Tripelhelices zu untersuchen, wurden auch die viskoelastischen Eigenschaften der GeINB/GeIS-Lösungen nach einer Gelierung bei 14 °C über einen Frequenzdurchlauf ermittelt. Die Speicher- und Verlustmodule der drei Varianten sind in Abbildung 51 C dargestellt. Die Speichermodule G' lagen für alle drei Varianten deutlich über den Verlustmodulen G''. Damit wurde die Gelierung zum festen Gel durch ein Abkühlen der Lösungen nochmals bestätigt.

Um die Varianten *low*, *medium* und *high* untereinander besser vergleichen zu können, wurden aus den Daten des Frequenzdurchlaufs die Plateau-Speichermodule G' der einzelnen Varianten ermittelt. Diese sind in Abbildung 51 D dargestellt. Die Speichermodule G' der einzelnen Varianten sanken von *low* nach *high* kontinuierlich ab. So betrug das Speichermodul für *low* 350 Pa, für *medium* 270 Pa und für *high* 185 Pa. Hier war eine signifikante Abhängigkeit der Festigkeit des physikalisch gelierten Gels vom Funktionalisierungsgrad zu detektieren. Je mehr Norbornen- und Thiolgruppen die Polymerlösungen enthielten, desto geringer war die Festigkeit des entstehenden Gels. Die Norbornen und die Thiolgruppen der Photopolymere könnten die Bildung der Tripelhelices durch sterische Effekte behindern und so den Gelierungsprozess bei niedrigen Temperaturen stark verlangsamen. Im Vergleich zum Plateau-Speichermodul von unfunktionalisierter Gelatine (1000 Pa) lagen alle drei GeINB/GeIS-Varianten deutlich darunter. Auch im Vergleich zu den Plateau-Speichermodulen der GeINB/DTT-Varianten waren die Speichermodule der GeINB/GeIS-Varianten geringer. Somit könnte nicht nur die Norbornengruppe, sondern auch die Thiolgruppe eine große Rolle bei der Behinderung

der Tripelhelices-Bildung spielen. Zusätzlich wurden die Schermodule der drei Photopolymerlösungen auch bei 37 °C bestimmt. Dabei lagen die Verlustmodule G'' über den Speichermodule G' , wodurch das flüssige Verhalten der Lösungen bei 37 °C nochmals bestätigt wurde. Die Ergebnisse sind im Anhang in Abbildung 130 D dargestellt.

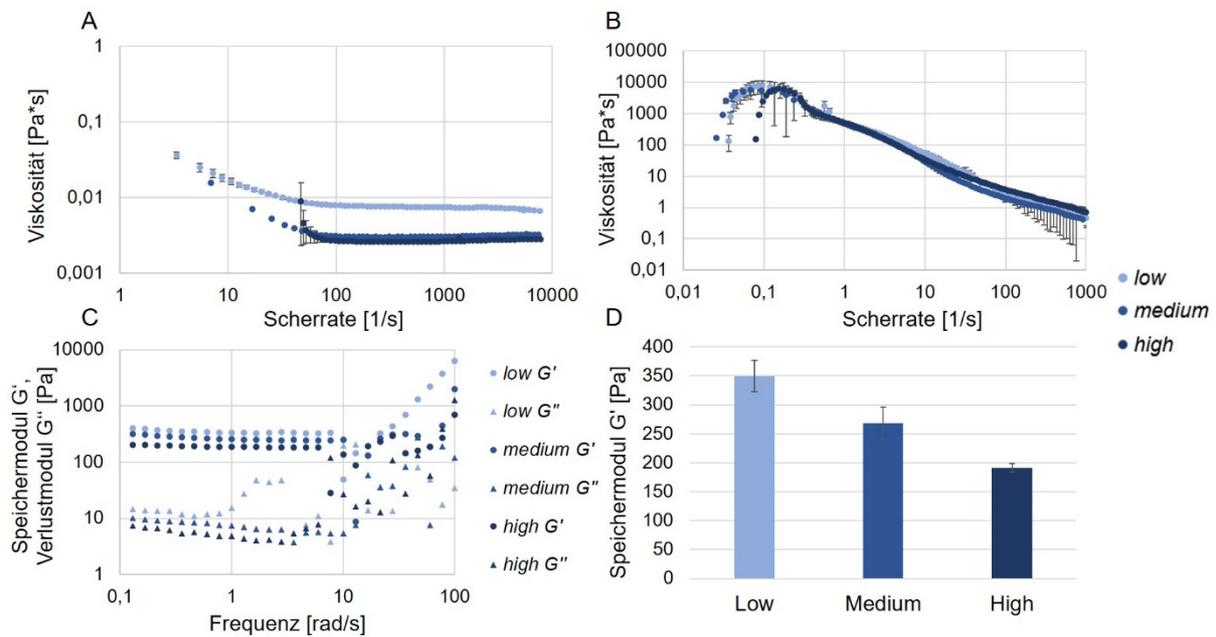


Abbildung 51: Rheologische Eigenschaften der nicht-vernetzten 5%igen GelNB/GelS-Polymerlösungen. **A:** Scherviskosität der drei Photopolymerlösungen low, medium und high bei 37 °C. **B:** Scherviskosität der drei Photopolymerlösungen low, medium und high bei 14 °C. **C:** Daten des Frequenzdurchlaufs (Speichermodule G' , Verlustmodule G'') für die drei Photopolymerlösungen bei 14 °C. **D:** Plateau-Speichermodule G' der drei nicht-vernetzten Polymerlösungen bei 14 °C.

Insgesamt wiesen alle untersuchten Photopolymerlösungen GelMA-V1, GelMA-V2, GelNB/DTT, GelNB/GelS als auch Gelatine ein scherverdünnendes Verhalten für niedrige Temperaturen auf. Durch die Selbstassemblierung der Tripelhelices bei niedrigen Temperaturen werden die bei höheren Temperaturen flüssigen Polymerlösungen zu einem festen Gel. Diese Assemblierung ist ein physikalischer Prozess und dadurch reversibel. Nimmt die Scherrate zu, lösen sich die Tripelhelices voneinander und verflüssigen die Polymerlösungen wieder. Dieser Vorgang ist in Abbildung 52 dargestellt.

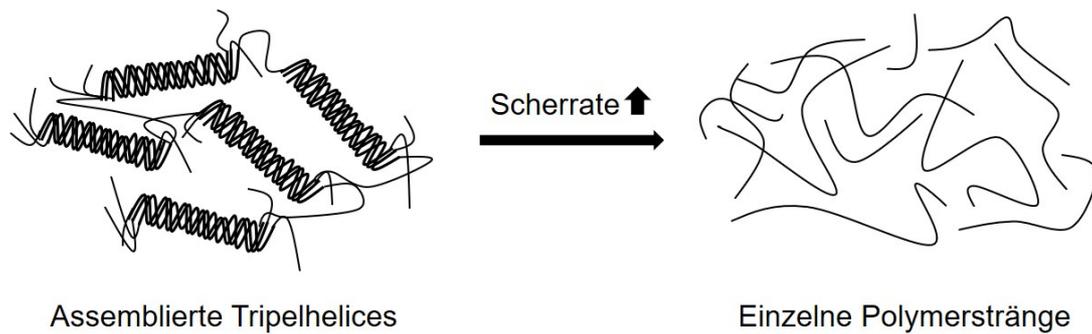


Abbildung 52: Auflösung der assemblierten Kollagen-Tripelhelices bei Krafteinwirkung durch die zunehmende Scherrate. Dies bewirkt die Verflüssigung der Polymerlösung.

Dieser Effekt kann bei extrusionsbasierten Biodruckverfahren genutzt werden, da sich die gelierten Polymere bei höheren Scherraten, die z.B. in Nadelöffnungen vorliegen, verflüssigen. Sinkt die Scherrate, so bilden sich die Helices wieder aus und sorgen in gedruckten Konstrukten bis zur chemischen Vernetzung durch Licht für Formstabilität. Bei 37 °C wiesen alle untersuchten Polymerlösungen ein flüssiges Verhalten auf, ähnlich dem eines newtonschen Fluids. Es zeigte sich keine Abhängigkeit der Viskosität von der Scherrate. Die untersuchten Schermodule, besonders die Speichermodule G' bei 14 °C, unterschieden sich je nach Photopolymer. So lagen die Werte für GelMA-V1 und GelMA-V2 bei ca. 1000 Pa und glichen damit dem Wert von unfunktionalisierter Gelatine. Somit konnte kein Einfluss der Methacrylamidgruppe auf die Assemblierung der Tripelhelices detektiert werden. Die Speichermodule der GelNB/DTT-Varianten lagen mit 350 Pa bis 420 Pa deutlich unter dem Wert von unfunktionalisierter Gelatine. Somit konnte vermutet werden, dass die Norbornengruppe die Bildung der Tripelhelices durch sterische Effekte beeinflusst. Die geringsten Speichermodule wiesen die drei GelNB/GelS-Varianten auf. Diese lagen zwischen 350 Pa und 185 Pa. Es könnte dadurch nicht nur die Norbornengruppe an der sterischen Hinderung der Tripelhelices-Bildung beteiligt sein, sondern auch die Thiolgruppe des Photopolymers GelS. Zusätzlich konnte bei GelNB/GelS eine Abhängigkeit des Speichermoduls vom Funktionalisierungsgrad detektiert werden. Je weniger Norbornen- und Thiolgruppen vorhanden waren, desto höher war das Speichermodul G' nach der temperaturabhängigen Gelierung.

4.4.5 Rheologische Charakterisierung der vernetzten Hydrogele

Um die viskoelastischen Eigenschaften der vernetzten Hydrogele zu bestimmen wurden diese nach der Vernetzung mit der Aushärtungslampe Omnicure S2000 und vollständigem Quellen in DPBS^{-/-} rheologisch untersucht. Dabei wurden die Schermodule (Speichermodul G' und Verlustmodul G''), die Fließgrenze und die Scherviskosität der Hydrogele näher charakterisiert. Dies wurde in Kooperation mit Bruna Regina Maciel (Arbeitsgruppe Angewandte Mechanik, Institut für Mechanische Verfahrenstechnik, KIT) durchgeführt.

4.4.5.1 GelMA-V1

Um die Schermodule und damit die Festigkeit der vernetzten GelMA-V1-Hydrogele bei Zellkulturbedingungen (37 °C) zu bestimmen wurden diese zunächst als 5%ige Polymerlösungen angesetzt und unter der Aushärtungslampe Omnicure S2000 zum Hydrogel vernetzt. Anschließend wurden die Gele zum Quellen bei 4 °C in DPBS^{-/-} eingelegt. Die Messung erfolgte durch eine Oszillationsmessung bei 37 °C mit einer konstanten Amplitude von 1 Pa über einen Frequenzbereich von 0,1-100 rad/s mit einem Platte-Platte-Rheometer (Physica, MCR 501, Anton Paar GmbH). Die Ergebnisse des Frequenzdurchlaufs sind in Abbildung 53 A dargestellt. Die Speichermodule G' der einzelnen GelMA-V1-Varianten gaben die während der Messung gespeicherte Deformationsenergie an und repräsentierten das elastische Verhalten. Da die Werte der Speichermodule G' deutlich über den Werten der Verlustmodule G'' lagen, welche das viskose Verhalten der Proben repräsentierten, konnte die Vernetzung zu einem festen Gel durch die lichtinduzierte Polymerisation der GelMA-V1 Polymere bestätigt werden. Um die GelMA-V1-Varianten untereinander besser zu vergleichen, wurden die jeweiligen Plateau-Speichermodule der GelMA-V1 *low*-, *medium*- und *high*-Hydrogele ermittelt. Diese sind in Abbildung 53 B dargestellt. Eine Abhängigkeit des Speichermoduls G' vom Funktionalisierungsgrad wurde erwartet, da mit Zunahme der Methacrylamidgruppen am Gelatinerückgrat bei einer Vernetzung mehr funktionelle Gruppen miteinander reagieren und so ein dichtes Polymer Netzwerk bilden können. Es konnte jedoch für die GelMA-V1-Hydrogele eine solche Abhängigkeit nicht detektiert werden. Die einzelnen Speichermodule lagen bei 420 Pa für *low*, 375 Pa für *medium* und 370 Pa für *high* und damit in Bereichen, die für 5%ige GelMA-Hydrogele auch von Muñoz *et al.* detektiert wurden.²⁰⁰ Da sich GelMA-Hydrogele durch eine radikalische Kettenreaktion bilden, können auch inhomogene Netzwerke ausgebildet werden, da auch Methacrylamidgruppen miteinander reagieren können, welche sich an demselben Gelatinestrang befinden. Dadurch können einzelne Ketten untereinander nicht mehr vollständig vernetzt werden, was sich auf die Festigkeit der vernetzten Hydrogele auswirken kann.²²⁴ Um zu evaluieren, ob sich auch die vernetzten Hydrogele für einen Extrusionsdruckprozess als Biotinten eignen, wurden in einem weiteren Schritt die Fließgrenze und Scherviskosität der Hydrogele ermittelt.²⁴⁸ Die Fließgrenze (engl.: *yield stress*) bezeichnet die Grenze, ab der eine Probe anfängt plastisch auf eine bestimmte Krafteinwirkung zu reagieren und sich z.B. verflüssigt. Unterhalb der Fließgrenze findet lediglich eine elastische Deformation der Probe statt, nach Wegnahme der Krafteinwirkung stellt sich dabei der unverformte Zustand der Probe wieder her.²⁴⁹ Oberhalb dieser Fließgrenze kann die Scherviskosität der Proben bestimmt werden. Die Messung wurde durch einen Rotationsversuch über einen Schubspannungsbereich von 0,1 Pa bis 1000 Pa auf einem Platte-Platte-Rheometer (Physica MCR 501, Anton Paar GmbH) bei 37 °C durchgeführt. Die Deformationsprofile der Hydrogele sind in Abbildung 53 C dargestellt. Aus diesen wurden die Fließgrenzen der GelMA-V1-Hydrogele *low*, *medium* und *high* bestimmt. Diese sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Ermittelte Fließgrenzen der vernetzten GelMA-V1-Hydrogele *low*, *medium* und *high* bei 37 °C.

	<i>Low</i>	<i>Medium</i>	<i>High</i>
Fließgrenze [Pa]	67±3,5	163±43,1	156,5±30,4

Dabei wies GelMA-V1 *low* mit 67 Pa die geringste Fließgrenze auf, gefolgt von GelMA-V1 *high* mit 156,5 Pa und *medium* mit 163 Pa. Somit konnte ein Einfluss des Funktionalisierungsgrads auf die Fließgrenze der einzelnen GelMA-V1-Hydrogele detektiert werden. Je weniger Methacrylamidgruppen vorlagen, desto geringer waren der Grad der Vernetzung und die nötige Kraft, um die Hydrogele zu deformieren und zu verflüssigen.

Anhand der ermittelten Werte der Fließgrenze wurde in einem nächsten Schritt die Viskosität der Hydrogele untersucht, um zu evaluieren, ob diese auch in vernetztem Zustand als Biotinten für Extrusionsdruckprozesse verwendet werden können. Die Viskositätsprofile der GelMA-V1-Varianten sind in Abbildung 53 D dargestellt. Alle drei vernetzten Gele wiesen ein scherverdünnendes Verhalten auf. Die Viskosität sank mit Zunahme der Scherrate von 500 Pa·s auf 0,2 Pa·s ab. Somit könnten die Hydrogele auch bereits vor dem Druckprozess vernetzt werden. Durch das scherverdünnende Verhalten können diese viskosen Materialien während des Druckprozesses durch eine kleine Nadelöffnung extrudiert werden, da sie sich bei hohen Scherraten verflüssigen. Da bei den vernetzten Hydrogelen jedoch für eine Verflüssigung die kovalenten Bindungen aufgebrochen werden müssen, könnte die Formstabilität nach dem Druckprozess nicht gewährleistet sein. Da die Bildung/Trennung kovalenter Bindungen kein reversibler Vorgang ist, würde das Gel seine Festigkeit verlieren. Dieser Versuch zeigte jedoch, dass es theoretisch möglich wäre, die Hydrogele auch in vernetztem Zustand bei höheren Temperaturen zu verdrucken. Durch eine sehr kurze Belichtungszeit könnte die Photopolymerlösung zwar verfestigt, aber nicht vollständig vernetzt sein. Die scherverdünnende Eigenschaft würde einen anschließenden Extrusionsdruckprozess ermöglichen. Durch eine zusätzliche Bestrahlung der gedruckten Struktur im Anschluss an den Druckprozess könnten die verbleibenden funktionellen Gruppen miteinander vernetzt werden, sodass eine stabile Struktur entstehen würde.

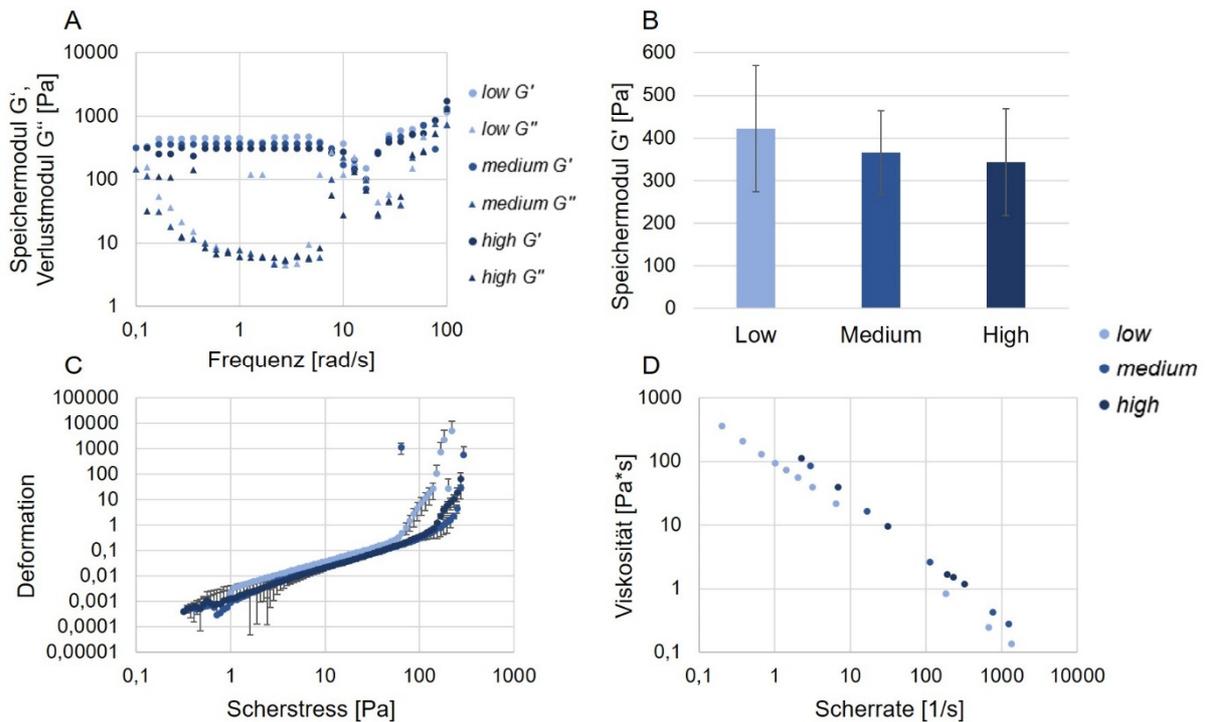


Abbildung 53: Rheologische Eigenschaften der vernetzten 5%igen GelMA-V1-Hydrogele. **A:** Daten des Frequenzdurchlaufs (Speichermodule G' , Verlustmodule G'') für die drei Hydrogele low, medium und high nach vollständigem Quellen bei 37 °C. **B:** Plateau-Speichermodule G' der drei vernetzten Hydrogele bei 37 °C. **C:** Deformationsprofile der Hydrogele bei 37 °C. **D:** Scherviskosität der drei GelMA-V1-Hydrogele low, medium und high bei 37 °C.

4.4.5.2 GelMA-V2

Da die Synthese für GelMA-V2 angepasst wurde, um Photopolymere zu erhalten, die ein breiteres Spektrum an Funktionalisierungsgraden abdeckten, wurden auch die Schermodule der vernetzten GelMA-V2-Hydrogele bei 37 °C bestimmt. Dazu wurden diese zunächst als 5%ige Lösungen angesetzt, mit Photoinitiator versetzt und unter der Aushärtungslampe Omnicure S2000 zum Hydrogel vernetzt. Anschließend wurden die Gele zum Quellen bei 4 °C in DPBS⁻ eingelegt. Die Messung erfolgte durch eine Oszillationsmessung bei 37 °C mit einer konstanten Amplitude von 1 Pa über einen Frequenzbereich von 0,1-100 rad/s mit einem Platte-Platte-Rheometer (Physica, MCR 501, Anton Paar). Die Ergebnisse des Frequenzdurchlaufs sind in Abbildung 54 A dargestellt. Die Speichermodule G' der GelMA-V2-Hydrogele low, medium und high lagen deutlich über den Verlustmodulen G'' und repräsentierten das elastische Verhalten der Probe. Dies bestätigte die lichtinduzierte Vernetzung der Photopolymere zu einem festen Hydrogel. Um die Festigkeiten der einzelnen Varianten besser zu vergleichen wurden die Plateau-Speichermodule G' ermittelt. Diese sind in Abbildung 54 B dargestellt. Eine signifikante Abhängigkeit des Speichermoduls G' vom Funktionalisierungsgrad der Photopolymere und damit vom Vernetzungsgrad der Hydrogele konnte detektiert werden. Low wies mit 48 Pa das

geringste Speichermodul und damit die geringste Festigkeit auf. *Medium* wies ein Speichermodul von 325 Pa auf und *high* das größte mit einem Wert von 463 Pa. Je geringer der Funktionalisierungsgrad des GelMA-V2-Photopolymers war, desto geringer war der Vernetzungsgrad des daraus gebildeten Hydrogels sowie die Festigkeit des Hydrogels. Die Speichermodule der *medium* und *high* Gele ähnelten den Speichermodulen der GelMA-V1-Gele. Diese lagen ebenfalls in einem Bereich zwischen 300 Pa und 450 Pa. Der große Unterschied zwischen den Werten für GelMA-V1 *low*- und GelMA-V2 *low*-Hydrogele lag vermutlich am deutlichen Unterschied der beiden Funktionalisierungsgrade. Das Photopolymer GelMA-V2 *low* wies lediglich einen Funktionalisierungsgrad von 20 % auf, wohingegen das Photopolymer GelMA-V1 *low* einen von 68 % aufwies.

In einem nächsten Schritt wurden die Deformationsprofile der drei GelMA-V2-Hydrogele aufgezeichnet und daraus die jeweiligen Fließgrenzen bestimmt. Dies wurde durch einen Rotationsversuch über einen Schubspannungsbereich von 0,1 Pa bis 1000 Pa auf einem Platte-Platte-Rheometer (Physica MCR 501, Anton Paar GmbH) bei 37 °C durchgeführt. Die ermittelten Fließgrenzen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Ermittelte Fließgrenzen der vernetzten GelMA-V2-Hydrogele *low*, *medium* und *high* bei 37 °C.

	<i>Low</i>	<i>Medium</i>	<i>High</i>
Fließgrenzen [Pa]	79±36,8	82,3±39	89,5±13,4

Die Fließgrenzen für die drei Varianten lagen deutlich beieinander. Eine schwache Abhängigkeit von der Vernetzungsdichte und damit vom Funktionalisierungsgrad konnte jedoch detektiert werden. *Low* wies eine Fließgrenze von 79 Pa auf, *medium* eine von 82,3 Pa und *high* eine von 89,5 Pa. Damit lagen die Werte für GelMA-V2 deutlich unter denen für die GelMA-V1-Hydrogele. Ein Grund dafür könnte das unterschiedliche Quellverhalten der GelMA-V1- und GelMA-V2-Hydrogele sein. So konnten die GelMA-V2-Gele deutlich größere Flüssigkeitsmengen einlagern als die GelMA-V1-Hydrogele (siehe Kapitel 4.4.2). Durch die vermehrte Flüssigkeitseinlagerung könnten die GelMA-V2-Gele stärker gequollen sein wodurch die Fließgrenze herabgesetzt wurde. Anhand der ermittelten Fließgrenzen wurden die Viskositätsprofile der GelMA-V2-Hydrogele ab der Fließgrenze der Hydrogele aufgezeichnet. Diese sind in Abbildung 54 D dargestellt. Alle drei Hydrogele wiesen über den untersuchten Scherratenbereich ein schwerverdünnendes Verhalten auf. Wie bei den GelMA-V1-Hydrogelen muss hierbei jedoch beachtet werden, dass dabei die durch die lichtinduzierte Vernetzung gebildeten kovalenten Bindungen durch die Krafteinwirkung aufgebrochen sein könnten, sodass bei Einsatz der vernetzten Hydrogele als Biotinten eine anschließende Formstabilität bei Druckprozessen nicht gewährleistet werden kann.

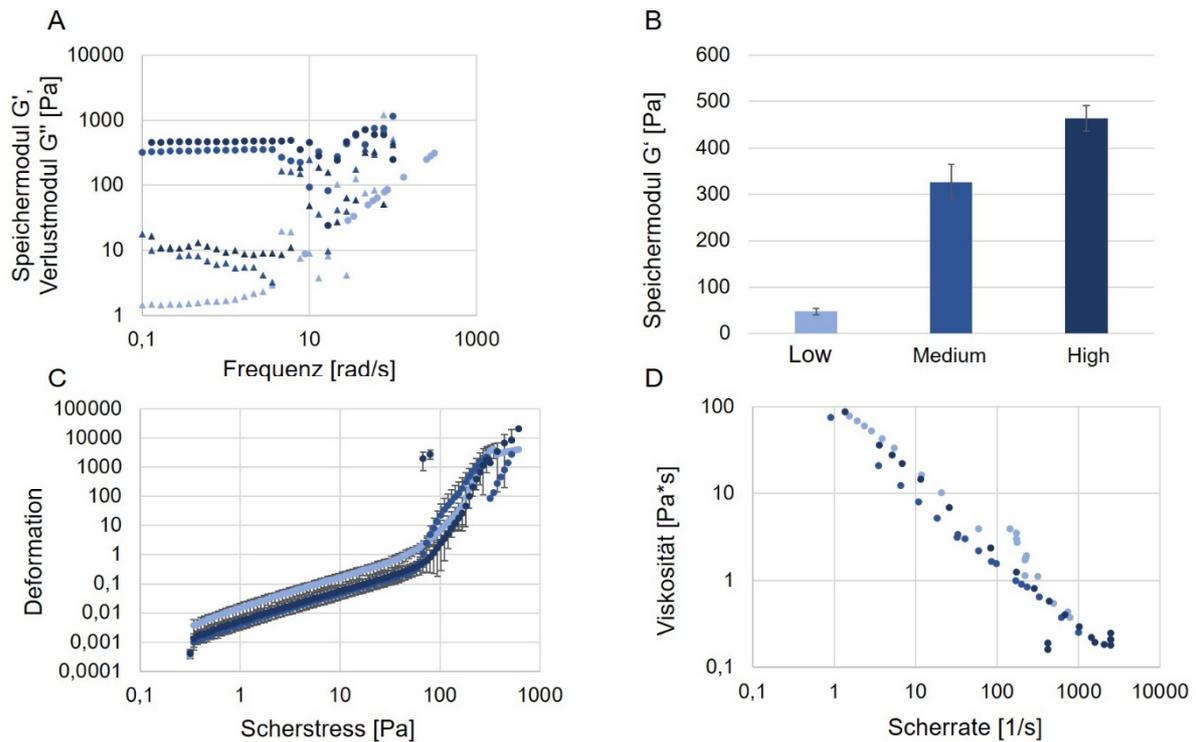


Abbildung 54: Rheologische Eigenschaften der vernetzten 5%igen GelMA-V2-Hydrogele. **A:** Daten des Frequenzdurchlaufs (Speichermodule G' , Verlustmodule G'') für die drei Hydrogele low, medium und high nach vollständigem Quellen bei 37 °C. **B:** Plateau-Speichermodule G' der drei vernetzten Hydrogele bei 37 °C. **C:** Deformationsprofile der Hydrogele bei 37 °C. **D:** Scherviskosität der drei GelMA-V2-Hydrogele low, medium und high bei 37 °C.

4.4.5.3 GeINB/DTT

Um die Schermodule und damit die Festigkeit der vernetzten GeINB/DTT-Hydrogele bei Zellkulturbedingungen (37 °C) zu bestimmen wurden diese zunächst als 5 %ige Polymerlösungen angesetzt, mit Photoinitiator und dem Crosslinker DTT versetzt und unter der Aushärtungslampe Omnicure S2000 zum Hydrogel vernetzt. Anschließend wurden die Gele zum Quellen in DPBS^{-/-} eingelegt. Die Messung erfolgte durch eine Oszillationsmessung bei 37 °C mit einer konstanten Amplitude von 1 Pa über einen Frequenzbereich von 0,1-100 rad/s mit einem Platte-Platte-Rheometer (Physica, MCR 501, Anton Paar GmbH). Die Ergebnisse des Frequenzdurchlaufs sind in Abbildung 55 A dargestellt. Die Speichermodule G' aller drei Varianten lagen über den kompletten Frequenzbereich deutlich über den Verlustmodulen G'' , wodurch die lichtinduzierte Vernetzung zum festen Hydrogel bestätigt wurde. Für einen besseren Vergleich der Speichermodule der drei Hydrogelvarianten wurden die Plateau-Speichermodule ermittelt und in Abbildung 55 B aufgetragen. Obwohl eine Abhängigkeit der Speichermodule vom Vernetzungsgrad der Hydrogele und damit vom Funktionalisierungsgrad der GeINB-Photopolymere erwartet wurde, konnte dies nicht detektiert werden. Die Speichermodule lagen für

alle drei Varianten bei ca. 100 Pa und damit deutlich unter denen der GelMA-Hydrogele (Ausnahme stellte GelMA-V2 *low* dar). Auch in der Literatur sind für GelNB/DTT *high*-Hydrogele Speichermodule von 500 Pa erreicht worden.²⁰⁰ Ein Grund für diese geringen Speichermodule könnte ein geringerer Vernetzungsgrad sein. So könnten die Gele nicht ausreichend belichtet worden sein, oder ein Teil des Crosslinkers DTT nicht mit den Norbornengruppen des Photopolymers GelNB reagiert haben. In einem nächsten Schritt wurden die Deformationsprofile der drei GelMA-V2-Hydrogele aufgezeichnet und daraus die jeweiligen Fließgrenzen bestimmt. Dies wurde durch einen Rotationsversuch über einen Schubspannungsbereich von 0,1 Pa bis 1000 Pa auf einem Platte-Platte-Rheometer (Physica MCR 501, Anton Paar GmbH) bei 37 °C durchgeführt. Die Fließgrenzen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Ermittelte Fließgrenzen der vernetzten GelNB/DTT-Hydrogele *low*, *medium* und *high* bei 37 °C.

	<i>Low</i>	<i>Medium</i>	<i>High</i>
Fließgrenze [Pa]	87,5±16,3	102,5±21,9	127±1,4

Die GelNB/DTT *low*-Hydrogele wiesen eine Fließgrenze von 87,5 Pa auf, *medium*-Hydrogele eine von 102,5 Pa und *high*-Hydrogele eine von 127 Pa. Damit war eine leichte Abhängigkeit der Fließgrenze vom Vernetzungsgrad der Hydrogele und damit vom Funktionalisierungsgrad der Photopolymere GelNB detektierbar. Je höher der Vernetzungsgrad des Hydrogels, desto mehr Kraft musste aufgewendet werden um das Hydrogel plastisch zu deformieren. Anhand der ermittelten Fließgrenzen wurden die Viskositätsprofile der GelNB/DTT-Hydrogele ab der Fließgrenze der Hydrogele bei 37 °C aufgezeichnet. Diese sind in Abbildung 55 D dargestellt. Auch hier zeigten alle drei Hydrogelvarianten ein scherverdünnendes Verhalten, die Viskositäten sanken mit zunehmender Scherrate ab. Somit könnten die Hydrogele als Biotinten für extrusionsbasierte Biodruckprozesse eingesetzt werden. Da die Messung jedoch bei 37 °C stattfand gilt zu beachten, dass bei diesem Prozess die kovalenten Bindungen innerhalb des Hydrogels durch die äußere Krafteinwirkung teilweise aufgebrochen sein könnten, wodurch sich das Hydrogel verflüssigen würde. Dadurch könnte die Formstabilität nach einem Druckprozess nicht mehr vorhanden sein, da die Bildung und Trennung kovalenter Bindungen keine reversiblen Prozesse sind.

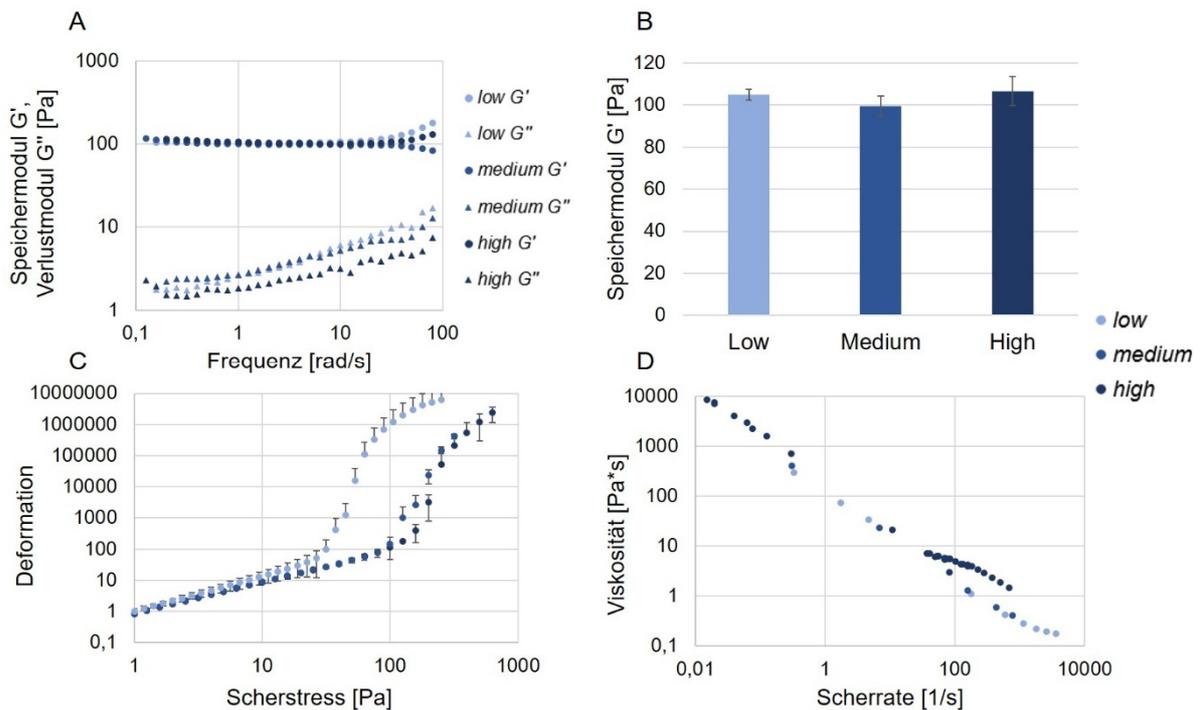


Abbildung 55: Rheologische Eigenschaften der vernetzten 5%igen GeINB/DTT-Hydrogele. **A:** Daten des Frequenzdurchlaufs (Speichermodule G' , Verlustmodule G'') für die drei Hydrogele low, medium und high nach vollständigem Quellen bei 37 °C. **B:** Plateau-Speichermodule G' der drei vernetzten Hydrogele bei 37 °C. **C:** Deformationsprofile der Hydrogele bei 37 °C. **D:** Scherviskosität der drei GeINB/DTT-Hydrogele low, medium und high bei 37 °C.

4.4.5.4 GeINB/GeIS

Um die Schermodule und damit die Festigkeit der vernetzten GeINB/GeIS-Hydrogele bei 37 °C zu bestimmen, wurden diese zunächst als 5%ige Polymerlösungen angesetzt, mit Photoinitiator versetzt und unter der Aushärtungslampe Omnicure S2000 zum Hydrogel vernetzt. Anschließend wurden die Gele zum Quellen in DPBS⁻ eingelegt. Die Messung erfolgte durch eine Oszillationsmessung bei 37 °C mit einer konstanten Amplitude von 1 Pa über einen Frequenzbereich von 0,1-100 rad/s mit einem Platte-Platte-Rheometer (Physica, MCR 501, Anton Paar GmbH). Die Ergebnisse des Frequenzdurchlaufs sind Abbildung 56 A dargestellt. Die Speichermodule G' der drei GeINB/GeIS-Hydrogele lagen über den Verlustmodulen G'' und bestätigten somit die lichtinduzierte Vernetzung der Photopolymerlösungen zum festen Hydrogel. Zum Vergleich der drei Hydrogelvarianten untereinander wurden die jeweiligen Plateau-Speichermodule ermittelt. Diese sind in Abbildung 56 B dargestellt. Es konnte eine eindeutige Abhängigkeit des Speichermoduls G' und damit der Festigkeit vom Vernetzungsgrad der Hydrogele detektiert werden. Das Speichermodul lag für GeINB/GeIS low-Hydrogele bei 126 Pa, für medium bei 405 Pa und für high bei 521 Pa. Je mehr Norbornen- und Thiolgruppen für die Vernetzung vorlagen, desto dichter war das gebildete Polymernetzwerk und desto fester das resultierende Hydrogel. Die Werte

lagen in einem ähnlichen Bereich wie für die untersuchten GelMA-Hydrogele. Um die Krafterwirkung zu detektieren, ab der sich die vernetzten Gele verflüssigten, wurden Deformationsprofile der drei Hydrogelvarianten aufgezeichnet und daraus die jeweilige Fließgrenze bestimmt. Dies wurde durch einen Rotationsversuch über einen Schubspannungsbereich von 0,1 Pa bis 1000 Pa auf einem Platte-Platte-Rheometer (Physica MCR 501, Anton Paar GmbH) bei 37 °C durchgeführt. Die Fließgrenzen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Ermittelte Fließgrenzen der vernetzten GelNB/GelS-Hydrogele *low*, *medium* und *high* bei 37 °C.

	<i>Low</i>	<i>Medium</i>	<i>High</i>
Fließgrenze [Pa]	25,7±13,1	185±45,1	200,7±57,8

Auch für die GelNB/GelS-Hydrogele konnte eine Abhängigkeit der Fließgrenze vom Vernetzungsgrad der Hydrogele und damit dem Funktionalisierungsgrad der Photopolymere GelNB und GelS detektiert werden. Die Fließgrenze für *low* betrug 25,7 Pa, für *medium* 185 Pa und für *high* 200,7 Pa. Je dichter die Verknüpfung des Polymernetzwerks war, desto mehr Kraft musste aufgewendet werden um die Hydrogele plastisch zu verformen. Anhand der ermittelten Fließgrenze wurden die Viskositätsprofile der GelNB/GelS-Hydrogele ab der Fließgrenze der Hydrogele bei 37 °C aufgezeichnet. Diese sind in Abbildung 56 D dargestellt. Alle drei Hydrogelvarianten zeigten über den untersuchten Scherratenbereich von 0,1 s⁻¹ bis 10000 s⁻¹ ein scherverdünnendes Verhalten. Somit würden sich die vernetzten GelNB/GelS-Hydrogele auch als Biotinten für Extrusionsdruckprozesse eignen, da sie sich bei hohen Scherraten, die z.B. in Nadelöffnungen herrschen, verflüssigen. Da die Messung jedoch bei 37 °C durchgeführt wurde, werden bei der Verflüssigung der Hydrogele vermutlich kovalente Bindungen aufgebrochen. Da dieser Prozess nicht reversibel ist, kann sich dies auf die Formstabilität der Konstrukte nach dem Druckprozess negativ auswirken.

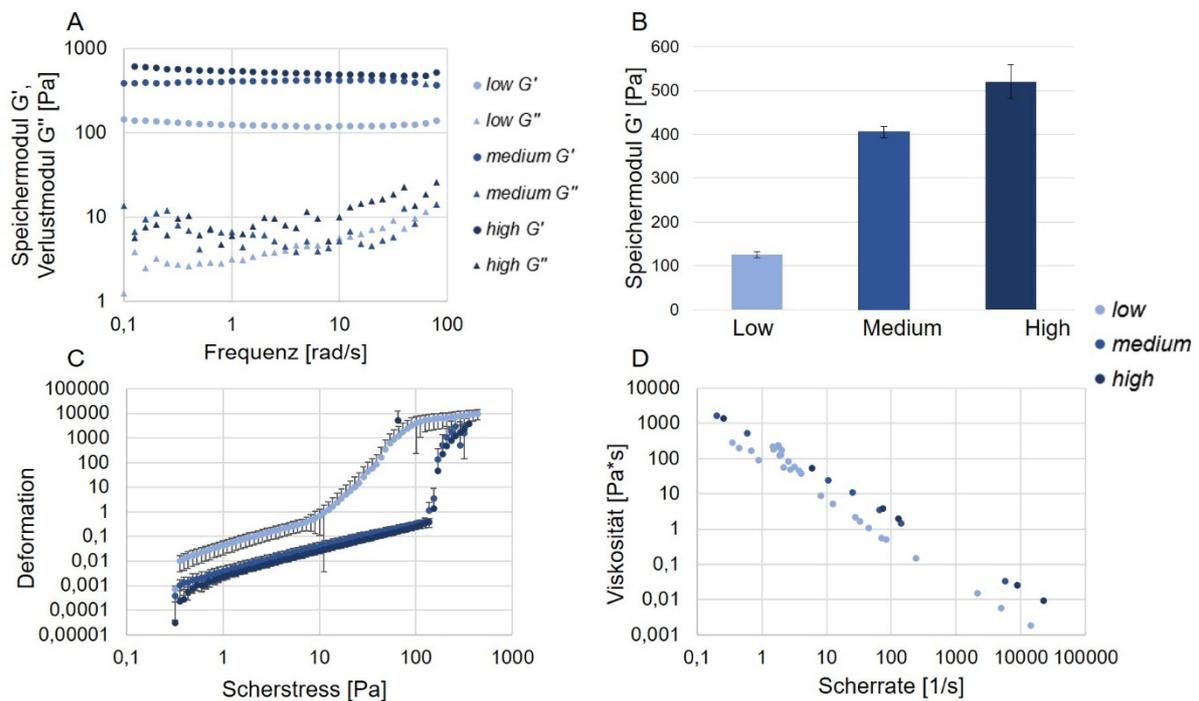


Abbildung 56: Rheologische Eigenschaften der vernetzten 5%igen GelNB/GelS-Hydrogele. **A:** Daten des Frequenzdurchlaufs (Speichermodul G' ; Verlustmodul G'') für die drei Hydrogele low, medium und high nach vollständigem Quellen bei 37 °C. **B:** Plateau-Speichermodul G' der drei vernetzten Hydrogele bei 37 °C. **C:** Deformationsprofile der Hydrogele bei 37 °C. **D:** Scherviskosität der drei GelNB/GelS-Hydrogele low, medium und high bei 37 °C.

Insgesamt konnten für alle Hydrogele Speichermodule mit bis zu 520 Pa detektiert werden. Die GelMA-Hydrogele wiesen Speichermodule von 300 Pa bis 450 Pa auf, lediglich GelMA-V2 low wies mit 26 Pa ein deutlich geringeres Speichermodul auf. Bei den GelMA-V2-Hydrogelen konnte eine Abhängigkeit des Vernetzungsgrads von den Speichermodulen und damit der Festigkeit detektiert werden. Dies konnte bei den GelNB/DTT-Hydrogelen nicht festgestellt werden. Hier lagen die Speichermodule aller Varianten bei ca. 100 Pa. Die GelNB/GelS-Hydrogele deckten jedoch ein breites Spektrum der Festigkeit ab. So wies GelNB/GelS low ein Speichermodul von 120 Pa auf und nahm über medium nach high auf 520 Pa zu. Auch hier konnte eine Abhängigkeit der Speichermodule vom Vernetzungsgrad von den Speichermodulen detektiert werden. Die ermittelten Fließgrenzen lagen für alle Hydrogele in Bereichen von 70 Pa bis 200 Pa. Die GelNB/GelS-Hydrogele medium und high wiesen mit 185 Pa und 200 Pa dabei die höchsten Werte auf. Alle untersuchten vernetzten Hydrogele zeigten bei einer Temperatur von 37 °C ein scherverdünnendes Viskositätsverhalten auf. Somit könnten Hydrogele auch in vernetztem Zustand als Biotinten für extrusionsbasierte Biodruckprozesse eingesetzt werden, da sie sich bei hohen Scherraten verflüssigen. Eine Verflüssigung der vernetzten Hydrogele bei 37 °C bedeutet jedoch, dass dabei vermutlich kovalente Bindungen aufgebrochen werden. Dies könnte sich negativ auf die Formstabilität des gedruckten Konstrukts auswirken, da ein solcher Prozess nicht reversibel ist. Eine mögliche Lösung wäre eine

kurzzeitige Belichtung der Photopolymerlösungen, sodass sich nur ein kleiner Anteil der funktionellen Gruppen miteinander vernetzen und die Polymerlösung dadurch verfestigen würde. Nach dem anschließenden Druckprozess könnte die gedruckte Struktur nochmals belichtet werden, sodass die restlichen funktionellen Gruppen miteinander reagieren und dem Konstrukt die benötigte Formstabilität verleihen könnten.

4.4.6 Rheologische Charakterisierung zellbeladener Hydrogele

Zur Generierung von 3D-Gewebemodellen im Bereich des *Tissue Engineering* werden Zellen häufig direkt in Gele eingebettet und darin kultiviert. Um den Einfluss der eingebetteten Zellen auf die Schermodule (Speichermodul G' und Verlustmodul G'') der vernetzten Hydrogele GelMA-V2 *medium*, GelNB/DTT *medium* und GelNB/GelS *medium* zu charakterisieren wurden diese rheologisch untersucht. Dafür wurden die flüssigen Photopolymerlösungen mit dem Photoinitiator, eventuell benötigten Crosslinkern und humanen Fibroblasten NHDF in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ /ml versetzt, sodass die Polymerkonzentration 5 % betrug. Nach der Vernetzung zum festen Hydrogel unter der Aushärtungslampe Omnicure S2000 wurden die Gele mit Kulturmedium überschichtet und für sieben Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert, wobei zu den Zeitpunkten Tag 1 und Tag 7 Proben der Gele rheologisch in Bezug auf die viskoelastischen Eigenschaften charakterisiert wurden. Zusätzlich wurden zu den beiden Zeitpunkten mikroskopische Aufnahmen der Gele angefertigt um Veränderungen in der Zellmorphologie zu detektieren. Die rheologische Charakterisierung erfolgte über einen Oszillationsversuch mit einer konstanten Amplitude von 1 Pa über einen Frequenzbereich von 0,1-100 rad/s mit einem Platte-Platte-Rheometer (Physica MCR 501, Anton Paar GmbH) bei 37 °C. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 57 dargestellt.

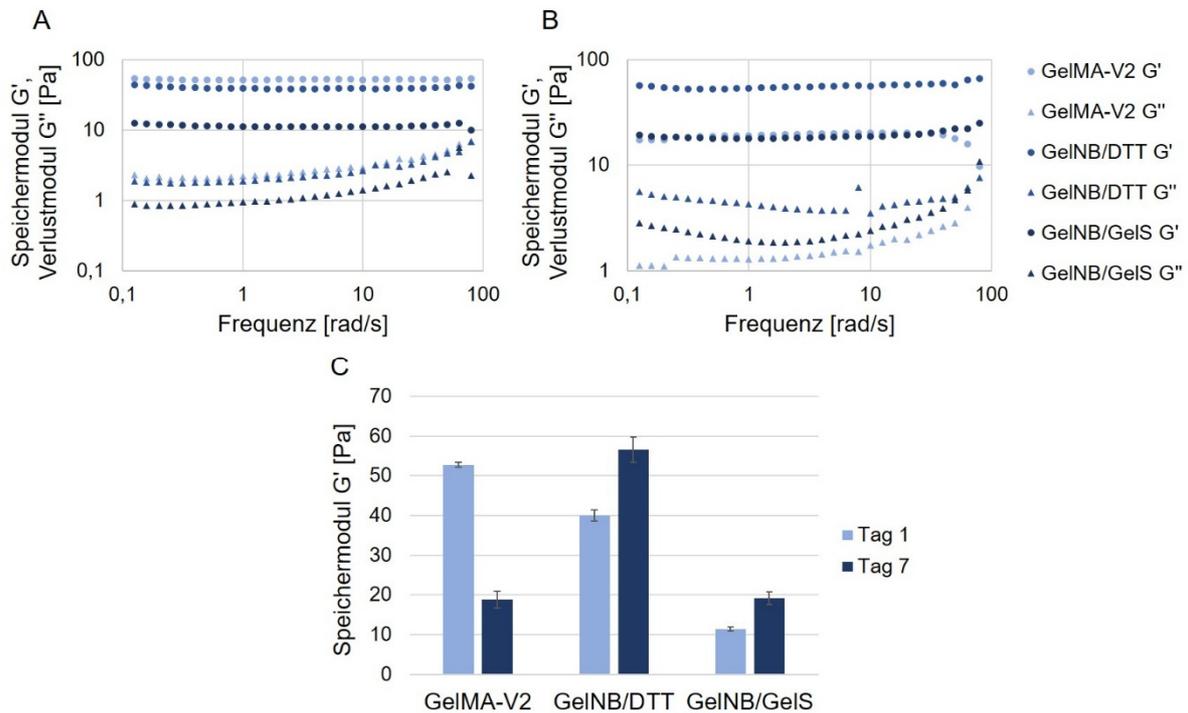


Abbildung 57: Rheologische Eigenschaften der vernetzten 5 %igen GelMA-V2-, GelNB/DTT- und GelNB/GelS-Hydrogele (jeweils in der medium-Variante) mit eingebetteten NHDF. **A:** Daten des Frequenzdurchlaufs (Speichermodul G' , Verlustmodul G'') für die drei Hydrogele nach Tag 1. **B:** Daten des Frequenzdurchlaufs (Speichermodul G' , Verlustmodul G'') für die drei Hydrogele nach Tag 7. **C:** Plateau-Speichermodul G' für die drei Hydrogele an Tag 1 und Tag 7.

Teilabbildung A zeigt die Ergebnisse der Messung nach einem Kultivierungstag, Teilabbildung B die Ergebnisse nach sieben Kultivierungstagen. Zu beiden Zeitpunkten lagen die Speichermodul G' deutlich für alle drei untersuchten Hydrogele über den Werten der Verlustmodul G'' und repräsentierten daher das elastische Verhalten der Hydrogele als Festkörper. Um die Speichermodul der einzelnen Hydrogele untereinander besser zu vergleichen, wurden die Plateau-Speichermodul der GelMA-V2 *medium*-, GelNB/DTT *medium*- und GelNB/GelS *medium*-Hydrogele aus den Frequenzverläufen an Tag 1 und Tag 7 bestimmt. Diese sind in Abbildung 57 C dargestellt. Nach einem Kultivierungstag wies das GelMA-V2 *medium*-Hydrogel ein Speichermodul von 52 Pa auf. Nach Tag 7 lag der Wert lediglich bei 18 Pa. Somit war für dieses Hydrogel eine Abnahme des Speichermodul und damit der Festigkeit zu verzeichnen. Dies könnte darauf hinweisen, dass das Gel durch die enthaltenen Zellen und Enzyme, die im Kultivierungsmedium vorlagen, teilweise abgebaut wurde. Der Vergleich der mikroskopischen Aufnahmen der Hydrogele an Tag 1 und Tag 7 ist in Abbildung 58 dargestellt. Eine 3D-Anordnung der Zellen im GelMA-V2 *medium*-Hydrogel ist sowohl an Tag 1 als auch an Tag 7 zu erkennen. Die Zellmorphologie der NHDF änderte sich in diesem Zeitraum jedoch nur minimal. An Tag 1 zeigten die Zellen eine runde Struktur, an Tag 7 konnten bereits die ersten Zellaus-

läufer detektiert werden, jedoch fand keine durchgehende Netzwerkbildung der Zellen innerhalb des Hydrogels statt. Die Werte der Speichermodule G' der GelNB/DTT *medium*-Hydrogele lagen bei 40 Pa an Tag 1 und 56 Pa an Tag 7. Somit war eine Zunahme des Speichermoduls und damit der Festigkeit des Hydrogels zu detektieren. Dies lässt vermuten, dass das Hydrogel durch die eingebetteten Zellen oder Enzyme aus dem Kultivierungsmedium nicht abgebaut wurde. Die Zunahme des Speichermoduls nach sieben Kultivierungstagen könnte durch eine Zunahme der Zellzahl zustande kommen. Es könnte aber auch auf der Netzwerkbildung der NHDF innerhalb des GelNB/DTT *medium*-Hydrogels beruhen. Dies ist in den mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 58 zu erkennen. Nach Tag 1 der Kultivierung zeigten die NHDF eine runde Zellstruktur auf, nach Tag 7 waren deutlich elongierte Zellen im Hydrogel zu erkennen, diese bildeten durch Verknüpfungen untereinander ein interzelluläres Netzwerk aus. Diese Netzwerkbildung könnte das Speichermodul des Gels ebenfalls positiv beeinflusst haben, da es neben der chemischen Vernetzung des Gels an sich eine zusätzliche Netzwerkbildung innerhalb des Hydrogels zwischen den Zellen für zusätzliche Festigkeit sorgen könnte. Auch für die GelNB/GelS *medium*-Hydrogele konnte eine Zunahme des Speichermoduls von 12 Pa auf 19 Pa detektiert werden (siehe Abbildung 57 C). Auch diese Zunahme lässt sich nach Betrachtung der mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 58 auf eine Zunahme der Zellzahl und der Netzwerkbildung der NHDF innerhalb des Hydrogels zurückzuführen sein. Auch hier konnte eine Elongation der Zellen und eine interzelluläre Netzwerkbildung durch alle Hydrogelebenen detektiert werden. Die Werte der Speichermodule der GelNB/GelS *medium*-Hydrogele lagen insgesamt deutlich unter den Werten für die GelMA-V2 *medium*- und GelNB/DTT *medium*-Hydrogele. Dies könnte daran liegen, dass diese Gele nicht lange genug ausgehärtet wurden und dadurch nicht alle Norbornen- und Thiolgruppen miteinander vernetzt waren. Es könnte jedoch auch bei der Synthese der Photopolymere GelNB und GelS ein Fehler unterlaufen sein, wodurch die Anzahl der Norbornen- und Thiolgruppen in den Photopolymeren nicht mit der sonstigen Anzahl übereinstimmte.

Die Speichermodule der vernetzten Hydrogele mit Zellen lagen mit Werten von unter 60 Pa alle deutlich unter jenen der vernetzten Gele ohne Zellen (siehe Kapitel 4.4.5). Dort lagen die Werte der Speichermodule bei 100 Pa bis 350 Pa. Dies könnte auf der Tatsache beruhen, dass die Gele mit den Zellen nicht nur mit DPBS^{-/-} angesetzt wurden, sondern auch mit Zellen und Kultivierungsmedium versetzt wurden. Des Weiteren wurden diese Gele bei 37 °C und nicht bei Raumtemperatur gelagert. Dies könnte sich auf das Quellverhalten der Gele ausgewirkt haben, wodurch diese noch mehr Flüssigkeit aufgenommen und dadurch weicher werden konnten.

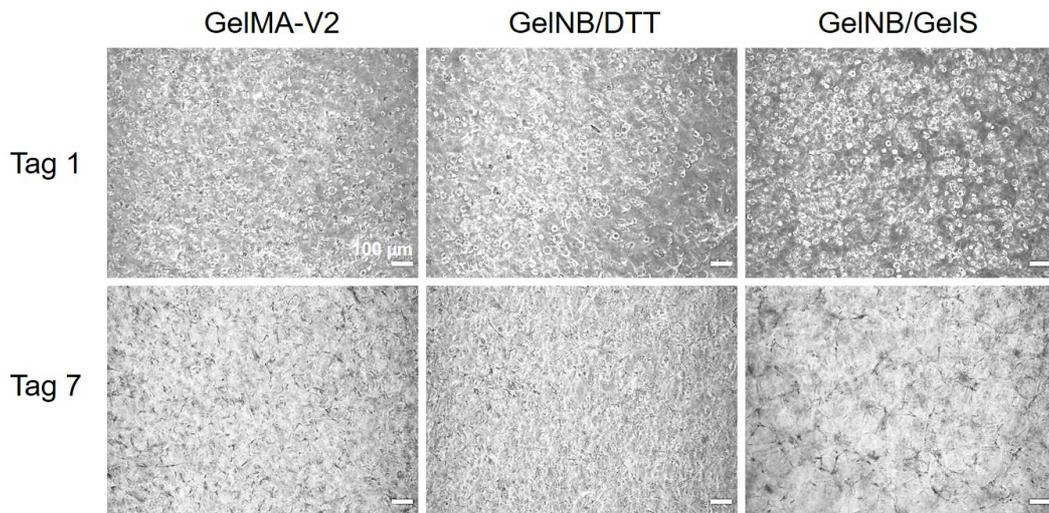


Abbildung 58: Hellfeldaufnahmen der verschiedenen Hydrogele GelMA-V2 medium, GelNB/DTT medium und GelNB/GelS medium mit eingebetteten NHDF ($2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) an Kultivierungstag 1 und Kultivierungstag 7. Maßstab: 100 μm . Lichtmikroskop Leica DMIL LED, 10x Objektiv.

Insgesamt konnte ein Einfluss der Zellen und der Zellmorphologie auf die Speichermodule der drei untersuchten Hydrogele GelMA-V2 medium, GelNB/DTT medium und GelNB/GelS medium detektiert werden. Bei einer starken Netzwerkbildung der Zellen nahm auch das Speichermodul der Hydrogele zu. Somit sorgte das interzelluläre Netzwerk für eine zusätzliche Festigkeit des Hydrogels.

4.5 Charakterisierung der Biokompatibilität der Hydrogele

Für die erfolgreiche Bildung von artifiziellem Gewebe ist die Biokompatibilität der eingesetzten Materialien von entscheidender Bedeutung. So sollten die eingebetteten Zellen in den Stützmaterialien proliferieren und migrieren können und die Matrix selbst keine Toxizität für die Zellen aufweisen.²⁵⁰ Zudem sollte sich auch der Herstellungsprozess des artifiziiellen Gewebes nicht negativ auf die Zellviabilität auswirken. Gelatine-basierte Hydrogele werden heutzutage häufig im Bereich des *Tissue Engineering* und der 3D-Zellkultur eingesetzt, da sie zellinteraktive Komponenten innerhalb der Aminosäuresequenz der Gelatine natürlich aufweisen.¹¹³ Zum einen die RGD-Domänen, welche als Zellbindedomänen dienen und so die Interaktion zwischen den Zellen und der Umgebungsmatrix über Integrinrezeptoren vermitteln.^{251,252} Zum anderen die enthaltenen MMP-Schnittstellen im Gelatinerückgrat. Diese bestimmte Aminosäuresequenz wird von Proteasen erkannt, welche das Gelatinerückgrat anschließend an dieser Stelle spalten können. Das Vorhandensein der MMP-Schnittstellen erlaubt eine enzymatische Degradation und Umstrukturierung der Umgebungsmatrix. Dies ist von großer Bedeutung für die Zellmigration und Zellausbreitung innerhalb des Stützmaterials.²⁵³⁻²⁵⁵

4.5.1 3D-Zelleinbettung

Die biologische Charakterisierung der vier Gelatine-basierten Hydrogele erfolgte durch eine 3D-Einbettung von verschiedenen Zelltypen in die verschiedenen Hydrogele mit einer anschließenden Kultivierung in den Stützmaterialien über einen Zeitraum von 21 Tagen. Dazu wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml in den jeweiligen Polymerlösungen resuspendiert, je 200 μ l der Suspension in die Wells eines 8-Well μ -Slides (ibidi GmbH) überführt und unter der Aushärtungslampe Omnicure S2000 zum Hydrogel vernetzt. Dieser Vorgang ist schematisch in Abbildung 59 dargestellt.

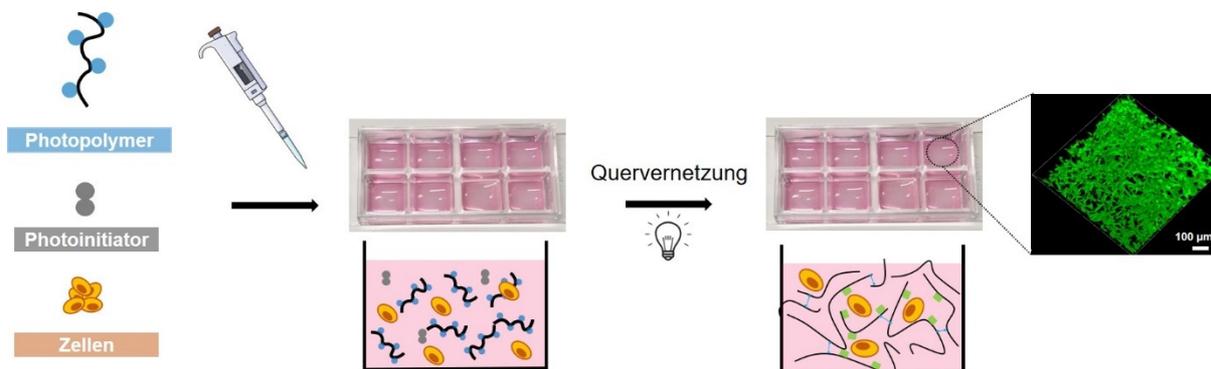


Abbildung 59: Schematische Darstellung der 3D-Zelleinbettung. Die Zellen wurden in den jeweiligen Photopolymerlösungen resuspendiert und in eine Zellkulturschale überführt. Durch eine Vernetzung der einzelnen Photopolymere wurden die Zellen in dem resultierenden Hydrogel eingekapselt und kultiviert. Die Evaluierung der Biokompatibilität der Hydrogele erfolgte abschließend durch eine Lebend/Tot-Färbung.

Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Evaluierung der Biokompatibilität erfolgte durch eine Lebend/Tot-Färbung der eingebetteten Zellen zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 mit Calcein-AM (4 μ M) und Propidiumiodid (0,02 mg/ml). Die Strukturformeln der beiden Färbereagenzien sind in Abbildung 60 dargestellt.

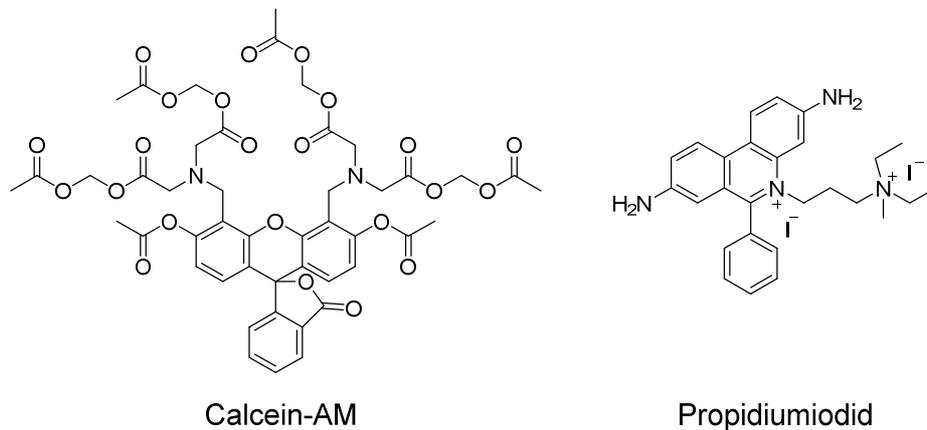


Abbildung 60: Strukturformeln der Färbereagenzien Calcein-AM und Propidiumiodid

Das Prinzip der Lebend/Tot-Färbung beruht darauf, dass lebende, metabolisch aktive Zellen durch zelleigene Esterasen das Calcein-AM zum grünen Fluoreszenzfarbstoff Calcein umwandeln können und dadurch grün fluoreszieren. PI dringt nur durch die geschädigte Membran nekrotischer Zellen ins Innere der Zellen ein und färbt die DNA der Zellen rot.²⁵⁶⁻²⁵⁸ Um die Eignung der Hydrogele als Stützmaterialien für möglichst viele Zelltypen zu untersuchen, wurden sowohl humane Krebszellen eines Leberkarzinoms (HepG2), primäre humane Hautfibroblasten (engl.: *normal human dermal fibroblasts*, NHDF) als auch primäre humane Nabelschnurendothelzellen (engl.: *human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) in den vier verschiedenen Hydrogelarten eingekapselt und über 21 Tage kultiviert. Die qualitative Auswertung erfolgte mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie. Die quantitative Bestimmung der Zellviabilitäten erfolgte mit Hilfe einer Software zur Bildauswertung.

4.5.1.1 3D-Einbettung von Leberkrebszellen

Zunächst wurde die Biokompatibilität der vier verschiedenen Hydrogele GelMA-V1, GelMA-V2, GelNB/DTT und GelNB/GelS anhand in den Gelen eingekapselter humaner Leberkrebszellen evaluiert. Durch das Mischen der Zellen mit den flüssigen Photopolymerlösungen wurde gewährleistet, dass die Zellen nach der Vernetzung in der 3D-Struktur eingekapselt sind.

GelMA-V1

Zunächst wurde die Biokompatibilität des GelMA-V1-Hydrogels in den Varianten *low*, *medium* und *high* auf den HepG2 Zellen untersucht. Die Ergebnisse der Lebend/Tot-Färbung (siehe Kapitel 4.5.1) zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 sind in Abbildung 61 dargestellt. Mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica TCE SPE) wurden Z-Stack Aufnahmen der Gele mit einer Höhe von 300 µm aufgezeichnet und anschließend mit der Software Leica LasX in 3D-Bilder rekonstruiert.

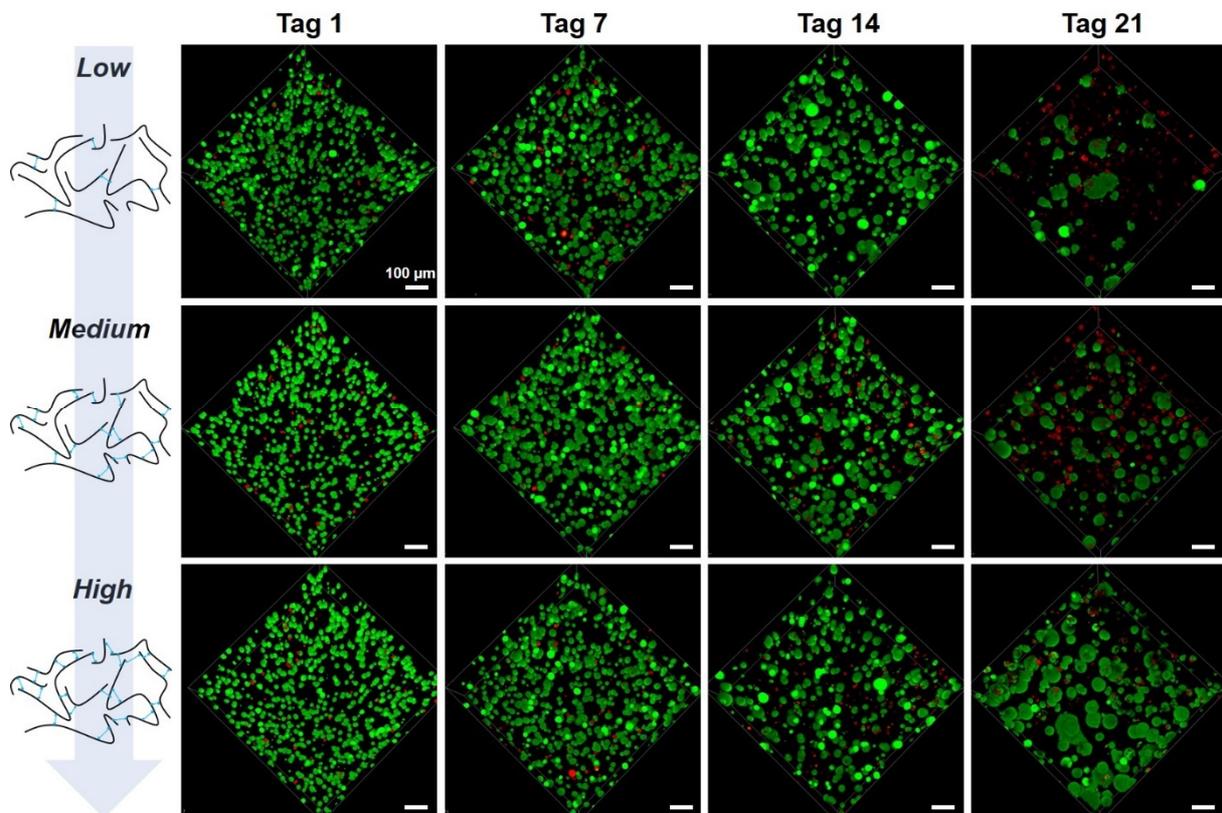


Abbildung 61: Kultivierung und Lebend/Tot-Färbung der im Hydrogel GelMA-V1 low, medium und high eingebetteten HepG2 Zellen (5 % GelMA-V1 mit 0,3 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml). Die Lebend/Tot-Färbung mit $4 \mu\text{M}$ Calcein-AM (grün, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$) und $0,02 \text{ mg/ml}$ Propidiumiodid (rot, $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}650 \text{ nm}$) wurde zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: $300 \mu\text{m}$, Schrittgröße $5 \mu\text{m}$). Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Leica LasX-Software. Maßstab: $100 \mu\text{m}$.

Für alle drei GelMA-V1-Varianten war ein sehr hoher Anteil grüner und damit lebender HepG2 Zellen über einen Zeitraum von 14 Tagen zu detektieren. Lediglich nach 21-tägiger Kultivierung der eingekapselten Zellen in den Hydrogelen war ein erhöhter Anteil roter und damit nekrotischer Zellen zu verzeichnen. Die Morphologie der Krebszellen änderte sich über den untersuchten Zeitraum nur minimal. Sowohl an Tag 1 als auch Tag 7 nach der Einbettung lagen die Zellen vereinzelt in den Gelen vor und wiesen eine runde Zellmorphologie auf. Nach 14 Tagen der Kultivierung im Hydrogel konnten größere Zellstrukturen beobachtet werden. Die Krebszellen lagerten sich zu sphäroidartigen Clustern zusammen. Diese waren auch nach Tag 21 in allen drei Hydrogelvarianten zu detektieren. Zur quantitativen Bestimmung der Viabilitäten wurde der Anteil lebender und toter Zellen mit Hilfe einer Software zur Bildauswertung in allen Ebenen der aufgenommenen Z-Stacks bestimmt. Die daraus ermittelten Viabilitäten der HepG2 Zellen sind in Abbildung 62 dargestellt.

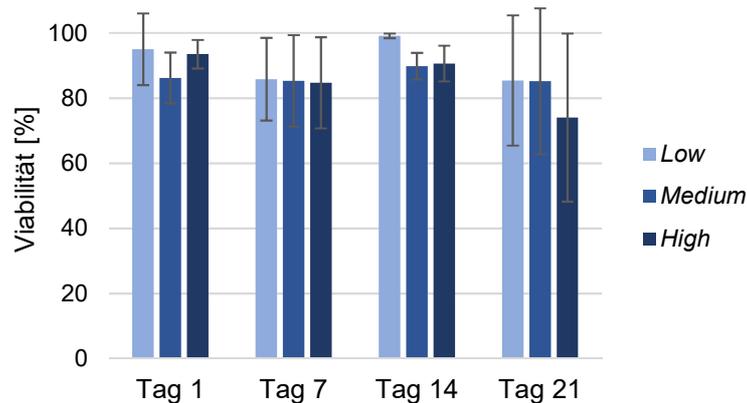


Abbildung 62: Viabilitäten der eingekapselten HepG2 Zellen in den GelMA-V1-Hydrogelen *low*, *medium* und *high* über einen Kultivierungszeitraum von 21 Tagen.

Die Viabilitäten der HepG2 Zellen lagen an Tag 1 für alle drei Varianten bei ca. 90 %. Somit konnte daraus geschlossen werden, dass sich der Vernetzungsprozess nur minimal auf die Viabilität der Zellen auswirkte. Auch nach Tag 7 und Tag 14 lag die Viabilität bei über 80 %. Lediglich nach 21-tägiger Kultivierung in den Hydrogelen sank die Zellviabilität für das GelMA-V1 *high*-Hydrogel leicht auf 70 % ab. Für die anderen beiden Varianten *low* und *medium* lag die Zellviabilität jedoch über den gesamten Zeitraum bei über 80 %. Auch Cui *et al.* konnten für eingekapselte HepG2 Zellen in GelMA-Hydrogelen Viabilitäten von bis zu 85 % erreichen.²⁵⁹ Dass sich die Zellen auch in allen Gelebenen befanden, wurde durch eine Tiefenfärbung der 3D-Bilder überprüft. Diese wurde mit der Leica-Software LasX erstellt und ist in Abbildung 63 dargestellt. Die Zellen lagen über den aufgenommenen Bereich von 300 µm in allen Ebenen verteilt vor. Damit wurde der erfolgreiche Einkapselungsprozess durch Resuspension der Zellen in den flüssigen Photopolymerlösungen nochmals bestätigt.

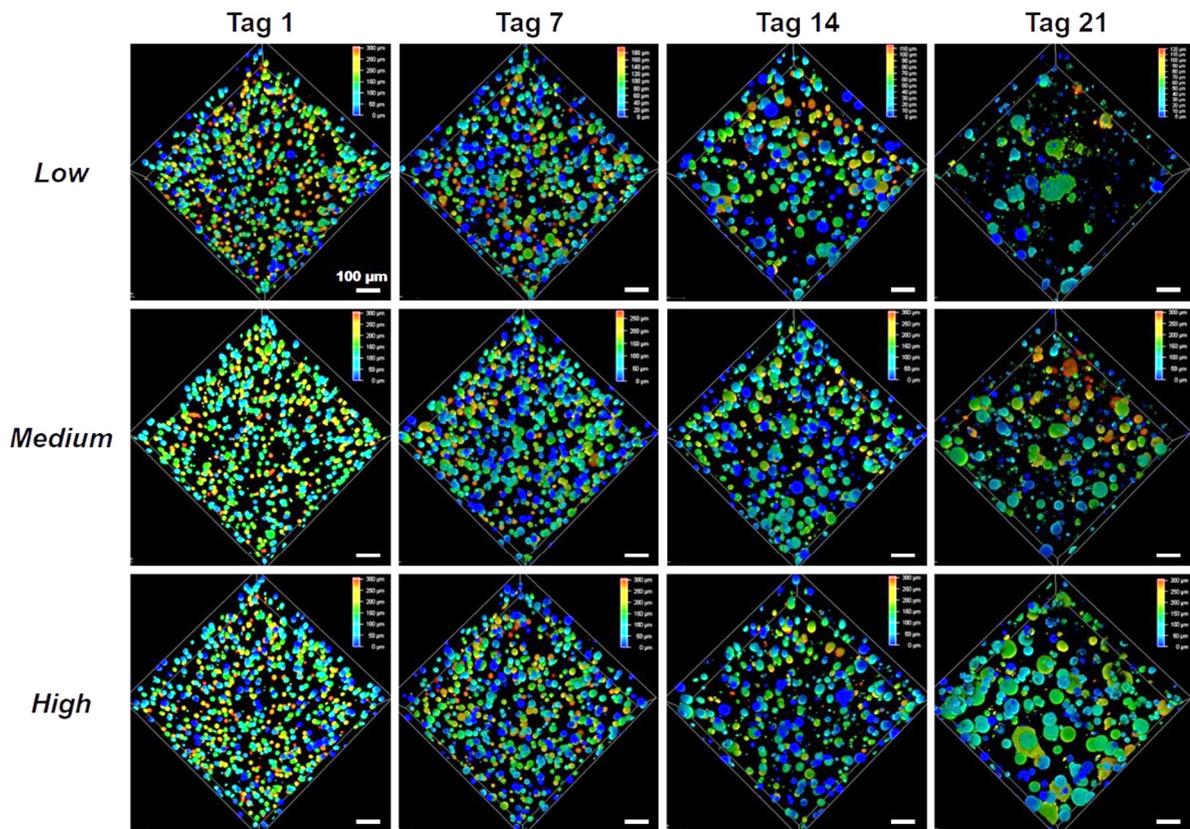


Abbildung 63: Tiefenfärbung der im Hydrogel GelMA-V1 low, medium und high eingebetteten HepG2 Zellen (5 % GelMA-V1 mit 0,3 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: 300 μm , Schrittgröße 5 μm). Die 3D-Rekonstruktion und Tiefenfärbung erfolgte mit der Leica LasX-Software. Skalierung der Tiefenfärbung: 50 μm , blau: 0 μm , rot: 300 μm . Maßstab: 100 μm .

GelMA-V2

Da sich die GelMA-V2-Hydrogele im Vernetzungsgrad von den GelMA-V1-Hydrogelen unterschieden, wurde auch die Biokompatibilität der GelMA-V2-Hydrogele *low*, *medium* und *high* an den HepG2 Zellen charakterisiert. Die Ergebnisse der Lebend/Tot-Färbung zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 sind in Abbildung 64 dargestellt. Mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica TCE SPE) wurden Z-Stack Aufnahmen der Gele mit einer Höhe von 300 μm aufgezeichnet und anschließend mit der Software Leica LasX in 3D-Bilder rekonstruiert.

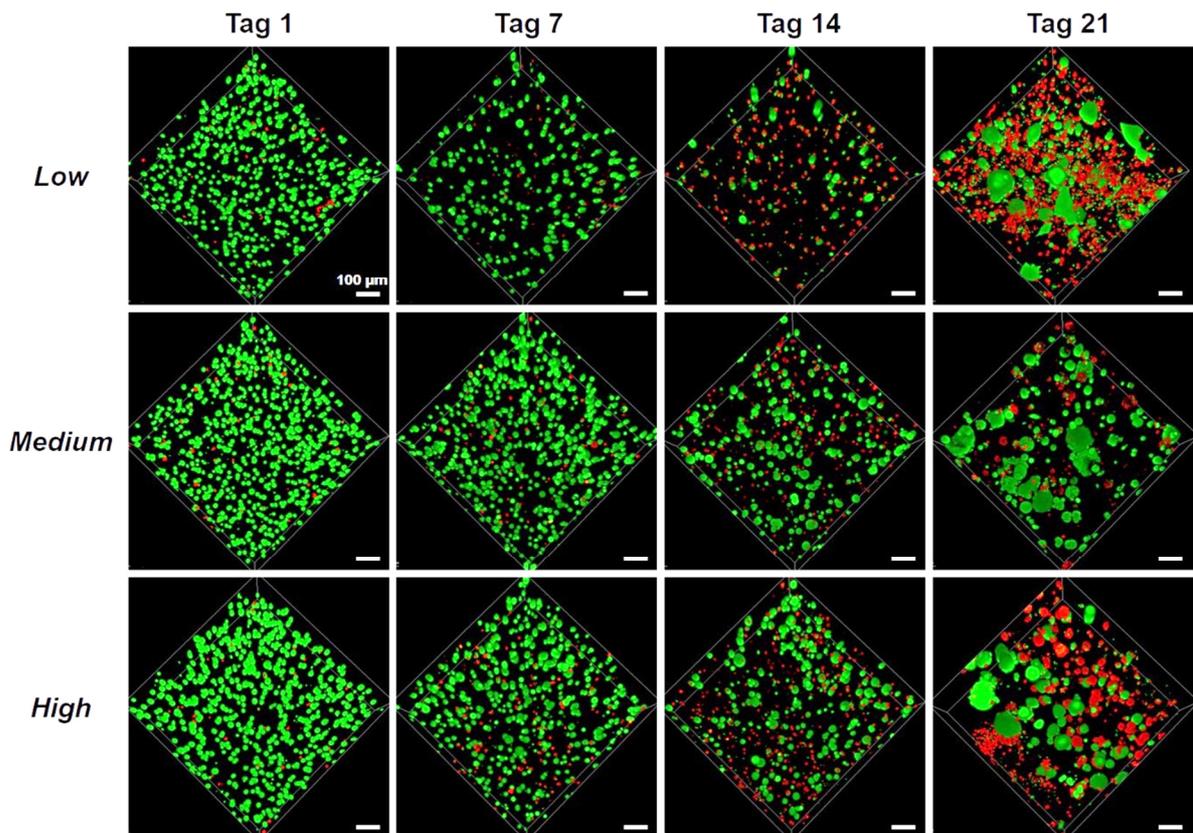


Abbildung 64: Kultivierung und Lebend/Tot-Färbung der im Hydrogel GelMA-V2 low, medium und high eingebetteten HepG2 Zellen (5 % GelMA-V2 mit 0,3 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml). Die Lebend/Tot-Färbung mit $4 \mu\text{M}$ Calcein-AM (grün, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$) und $0,02 \text{ mg/ml}$ Propidiumiodid (rot, $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}650 \text{ nm}$) wurde zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: $300 \mu\text{m}$, Schrittgröße $5 \mu\text{m}$). Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Leica LasX-Software. Maßstab: $100 \mu\text{m}$.

Für alle drei Hydrogelvarianten konnte ein hoher Anteil grüner und damit lebender Zellen für Tag 1 und Tag 7 detektiert werden. Ab Tag 14 nahm der Anteil roter und damit nekrotischer Zellen jedoch stark zu. Besonders im GelMA-V2 low-Hydrogel zeigte sich dieser Effekt sehr deutlich. Die Morphologie der Krebszellen änderte sich über den gesamten Kultivierungszeitraum nur gering. An Tag 1 und Tag 7 lagen die Zellen vereinzelt innerhalb der Gele vor und wiesen eine runde Struktur auf. Nach 21-tägiger Kultivierung lagerten sich die HepG2 zu sphäroidartigen Zellclustern zusammen. Um die Viabilitäten zu den verschiedenen Zeitpunkten untereinander besser zu vergleichen, wurden diese mit Hilfe einer Software zur Bildauswertung aus den aufgenommenen Z-Stacks bestimmt. Diese sind in Abbildung 65 dargestellt.

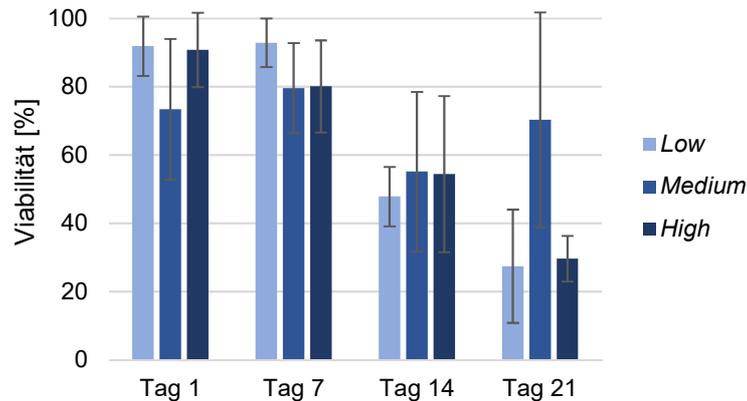


Abbildung 65: Viabilitäten der eingekapselten HepG2 Zellen in den GelMA-V2-Hydrogelen *low*, *medium* und *high* über einen Kultivierungszeitraum von 21 Tagen.

Wie qualitativ auf den 3D-Bildern bereits erkannt werden konnte, lag die Viabilität der HepG2 Zellen zu Kultivierungsbeginn bei 90 % für die beiden Varianten *low* und *high*. Lediglich die Viabilität der Krebszellen, welche im GelMA-V2 *medium*-Hydrogel eingekapselt waren, lag an Tag 1 bei ca. 70 %. Somit konnte auch hier bestätigt werden, dass sich der Vernetzungsprozess der GelMA-V2-Hydrogele nur minimal auf die Viabilität der eingekapselten HepG2 Zellen auswirkte. Über den Kultivierungszeitraum von 21 Tagen sank die Viabilität der Zellen jedoch deutlich ab. Bereits nach 14 Tagen lag der Anteil lebender Zellen für alle drei Gele lediglich zwischen 47 % und 54 % und sank an Tag 21 auf ca. 30 % ab. Nur im GelMA-V2 *medium*-Hydrogel konnte noch eine Zellviabilität von 70 % detektiert werden. Ein Grund dafür könnte die abnehmende Stabilität der Hydrogele über den untersuchten Zeitraum sein. Besonders das GelMA-V2 *low*-Hydrogel löste sich nach dieser Kultivierungsdauer stark auf. Dies war auch an den Tiefenfärbungen der 3D-Bilder zu erkennen. Diese wurden mit der Leica-Software LasX erstellt und sind in Abbildung 66 dargestellt. Zu Beginn der Kultivierung konnte eine gleichmäßige Verteilung der Krebszellen über die komplette Z-Stack-Höhe von 300 μm detektiert werden. Die Instabilität des *low*-Hydrogels zeigte sich jedoch bereits ab Tag 7. So konnte für dieses Gel nur ein Z-Stack mit einer Höhe von 200 μm aufgenommen werden. An Tag 14 und Tag 21 war das Gel bereits so stark abgebaut, dass lediglich eine Aufnahme mit einer Höhe von 120 μm durchgeführt werden konnte. Zusätzlich könnten die Gele durch die Mediumwechsel, die alle zwei Tage durchgeführt wurden, beschädigt worden sein, was sich ebenfalls negativ auf die Viabilität der eingekapselten Krebszellen ausgewirkt haben könnte.

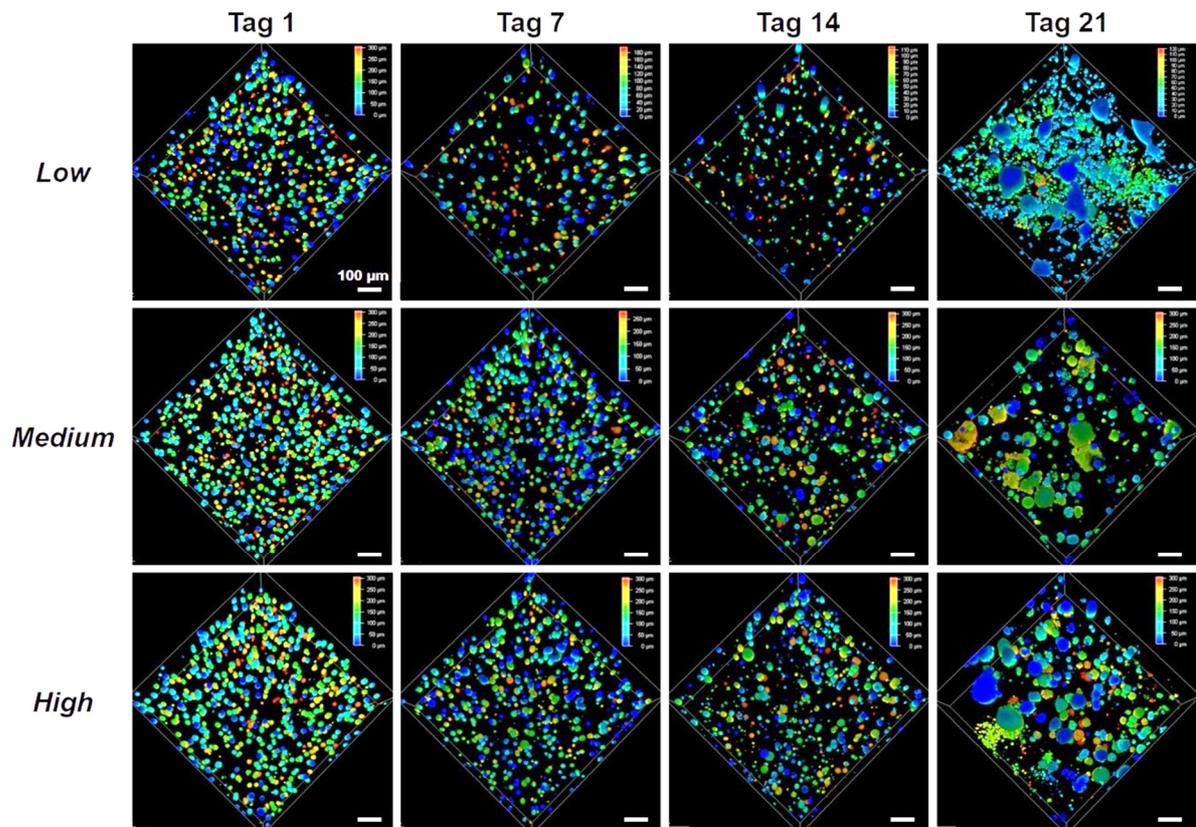


Abbildung 66: Tiefenfarbung der im Hydrogel GelMA-V2 low, medium und high eingebetteten HepG2 Zellen (5% GelMA-V2 mit $0,3\%$ LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, $10\times$ Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: $300\ \mu\text{m}$, Schrittgröße $5\ \mu\text{m}$). Die 3D-Rekonstruktion und Tiefenfarbung erfolgte mit der Leica LasX-Software. Skalierung der Tiefenfarbung: $50\ \mu\text{m}$, blau: $0\ \mu\text{m}$, rot: $300\ \mu\text{m}$. Maßstab: $100\ \mu\text{m}$.

GeINB/DTT

In einem nächsten Schritt wurde die Biokompatibilität der drei GeINB/DTT-Hydrogele *low*, *medium* und *high* anhand der eingebetteten Leberkrebszellen über einen Zeitraum von 21 Tagen untersucht. Die Ergebnisse der Lebend/Tot-Färbung (siehe Kapitel 4.5.1) sind in Abbildung 67 dargestellt. Mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica TCE SPE) wurden Z-Stack Aufnahmen der Gele mit einer Höhe von $300\ \mu\text{m}$ aufgezeichnet und anschließend mit der Software Leica LasX in 3D-Bilder rekonstruiert.

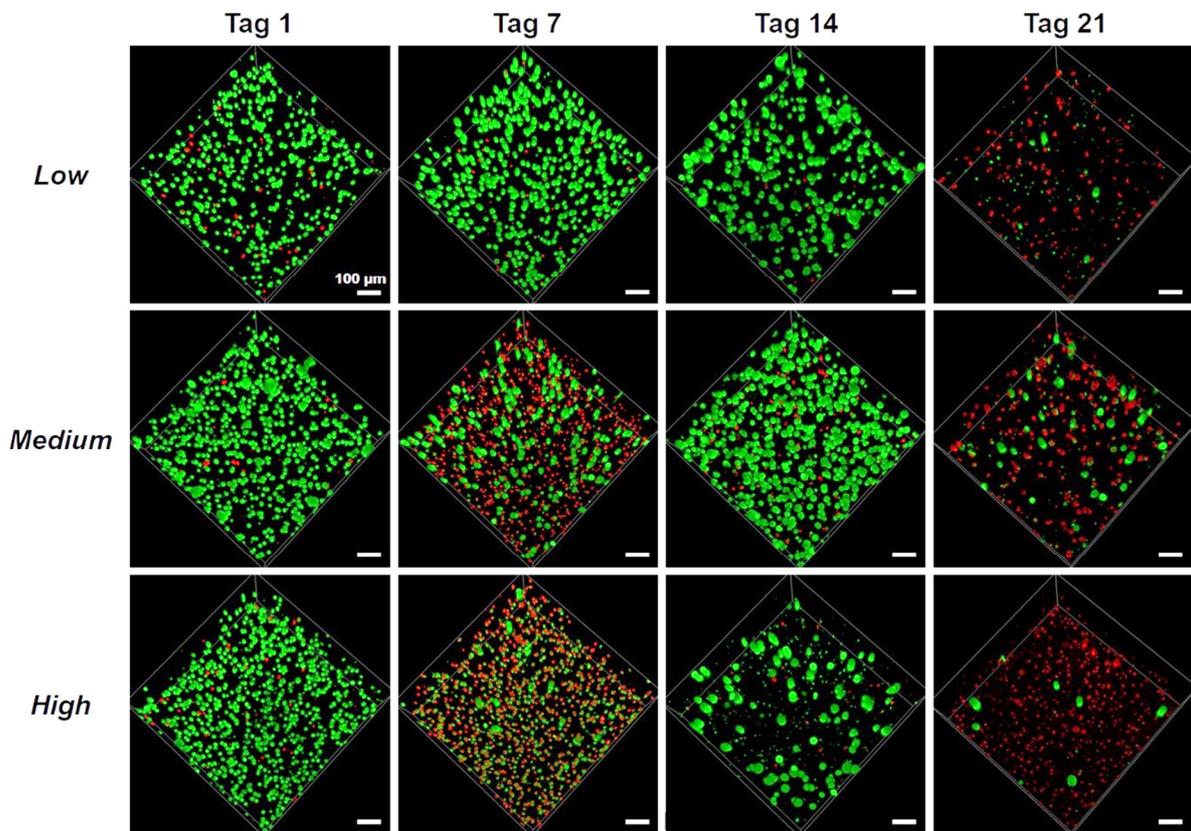


Abbildung 67: Kultivierung und Lebend/Tot-Färbung der im Hydrogel GelNB/DTT low, medium und high eingebetteten HepG2 Zellen (5 % GelNB mit 5,4 mM, 8mM oder 15 mM DTT, 0,03 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml). Die Lebend/Tot-Färbung mit $4 \mu\text{M}$ Calcein-AM (grün, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$) und $0,02 \text{ mg/ml}$ Propidiumiodid (rot, $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}650 \text{ nm}$) wurde zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: $300 \mu\text{m}$, Schrittgröße $5 \mu\text{m}$). Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Leica LasX-Software. Maßstab: $100 \mu\text{m}$.

An Tag 1 nach der Einkapselung in die Gele war ein hoher Anteil lebender Zellen in den verschiedenen Gelen zu erkennen. An Tag 7 wiesen die *medium*- und *high*-Varianten der GelNB/DTT-Hydrogele jedoch eine hohe Anzahl nekrotischer Zellen auf. Dies konnte an Tag 14 nicht beobachtet werden, in allen drei Gelvarianten war ein hoher Anteil lebender Zellen zu erkennen. Nach 21-tägiger Kultivierung sank die Viabilität jedoch stark ab. Auch die Zellmorphologie der HepG2 änderte sich über den Kultivierungszeitraum nicht. Sowohl an Tag 1 als auch an Tag 14 lagen die Zellen noch vereinzelt in einer runden Struktur vor. Eine Clusterbildung konnte für diese Gele nicht detektiert werden. Für eine genauere Charakterisierung der Viabilitäten wurde der Anteil lebender und toter Zellen in allen Z-Stack-Ebenen mit einer Software zur Bildauswertung bestimmt und daraus die Zellviabilität zu den verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Diese sind in Abbildung 68 dargestellt.

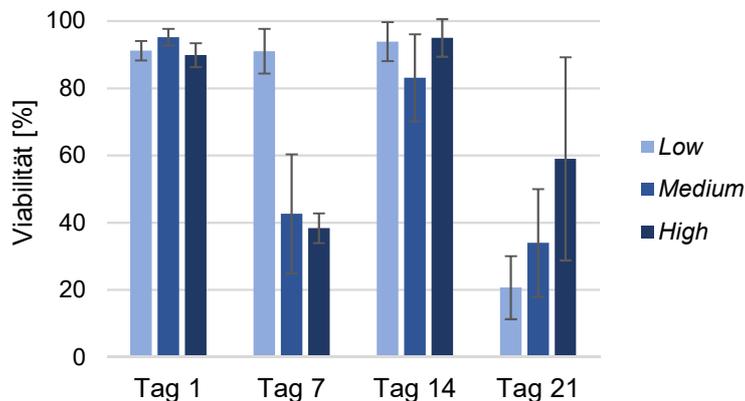


Abbildung 68: Viabilitäten der eingekapselten HepG2 Zellen in den GeINB/DTT-Hydrogelen low, medium und high über einen Kultivierungszeitraum von 21 Tagen.

Wie bereits auf den 3D-Bildern detektiert werden konnte, lag die Zellviabilität nach Kultivierungstag 1 für alle drei Gelvarianten bei über 90 %. Somit konnte daraus geschlossen werden, dass sich der lichtinduzierte Vernetzungsprozess nur minimal negativ auf die Viabilität der eingekapselten Zellen auswirkte. Während die Viabilität der Krebszellen in den *low* Gelen bis Tag 14 konstant bei ca. 90 % lag, sanken die Viabilitäten in den *medium* und *high* Gelen von Tag 1 nach Tag 7 von 90 % auf ca. 40 % ab, nahmen aber an Tag 14 wieder auf über 80 % zu. Da es sich bei der Lebend/Tot-Färbung um Endpunktbestimmungen handelt, mussten die Gele in vierfacher Ausführung angefertigt werden, sodass zu jedem Zeitpunkt eine Färbung durchgeführt werden konnte. Nun könnte das Gel, welches an Tag 7 gefärbt wurde, eventuell zuletzt vernetzt worden sein. Da die *medium*- und *high*-Varianten mit 8 mM und 15 mM deutlich mehr DTT enthielten als die *low*-Variante mit 5,4 mM könnte dieses toxisch auf die HepG2 Zellen gewirkt haben (siehe Kapitel 4.2.3). Für alle drei Varianten lag die Viabilität an Tag 21 bei unter 60 %. *Low* wies dabei mit ca. 20 % die geringste Viabilität auf. Eventuell wurden auch hier die Gele nach 21 Tagen vermehrt instabil und begannen sich aufzulösen, oder wurden durch die Mediumwechsel beschädigt, was sich negativ auf die Zellviabilität auswirkte. Die Gleichmäßige Verteilung der Zellen in allen Gelebenen wurde durch eine Tiefenfärbung der 3D-Bilder überprüft. Diese wurde mit der Leica-Software LasX erstellt und ist in Abbildung 69 dargestellt. Die Zellen lagen über den aufgenommenen Bereich von 300 μm in allen Ebenen verteilt vor. An Tag 21 konnten nur vereinzelt Zellen in den drei Gelen detektiert werden. Diese könnten durch Mediumwechsel aus den Gelen gespült worden sein oder sind durch ein Auflösen der Gele ins überstehende Medium gelangt.

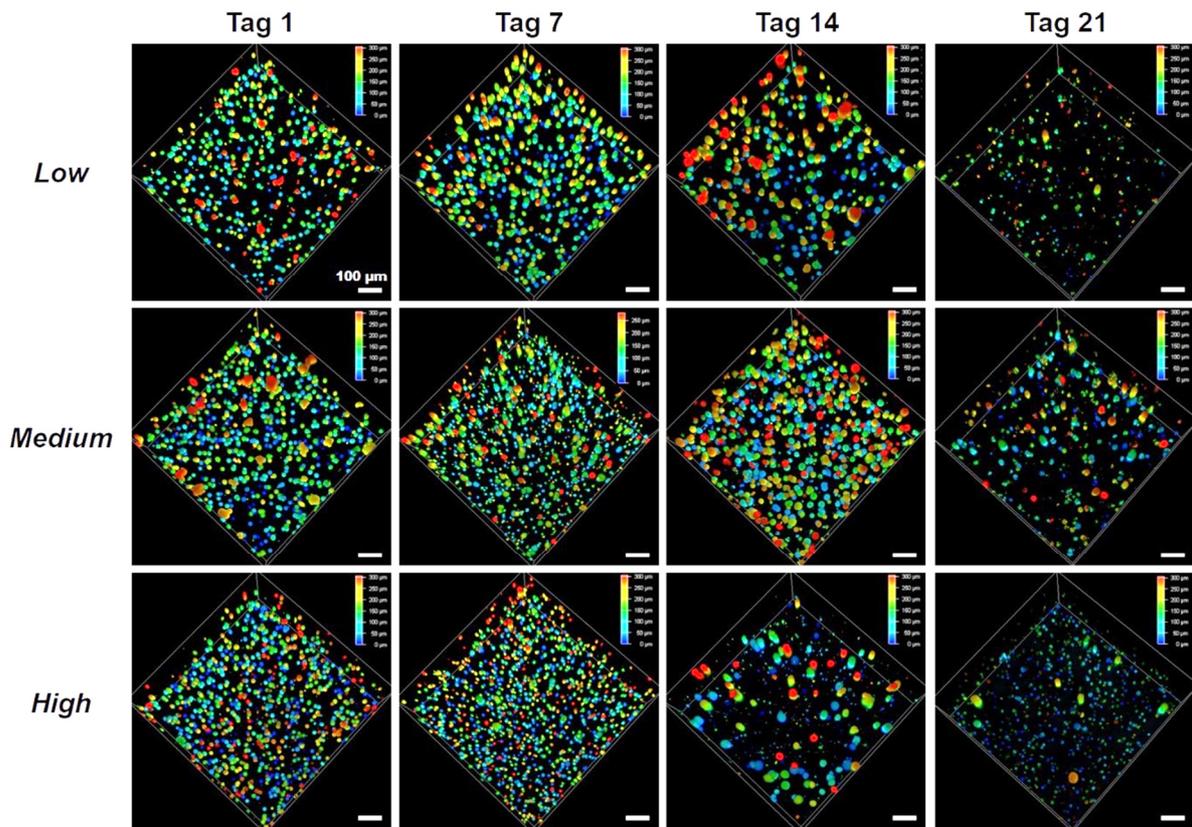


Abbildung 69: Tiefenfärbung der im Hydrogel GeINB/DTT low, medium und high eingebetteten HepG2 Zellen (5 % GeINB mit 5,4 mM, 8mM oder 15 mM DTT, 0,03 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: 300 μm , Schrittgröße 5 μm). Die 3D-Rekonstruktion und Tiefenfärbung erfolgte mit der Leica LasX-Software. Skalierung der Tiefenfärbung: 50 μm , blau: 0 μm , rot: 300 μm . Maßstab: 100 μm .

GeINB/GelS

In einem nächsten Schritt wurde die Biokompatibilität der drei neuartigen GeINB/GelS-Hydrogele *low*, *medium* und *high* anhand der eingebetteten Leberkrebszellen über einen Zeitraum von 21 Tagen untersucht. Die Ergebnisse der Lebend/Tot-Färbung (siehe Kapitel 4.5.1) sind in Abbildung 71 dargestellt. Mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica TCE SPE) wurden Z-Stack Aufnahmen der Gele mit einer Höhe von 300 μm aufgezeichnet und anschließend mit der Software Leica LasX in 3D-Bilder rekonstruiert.

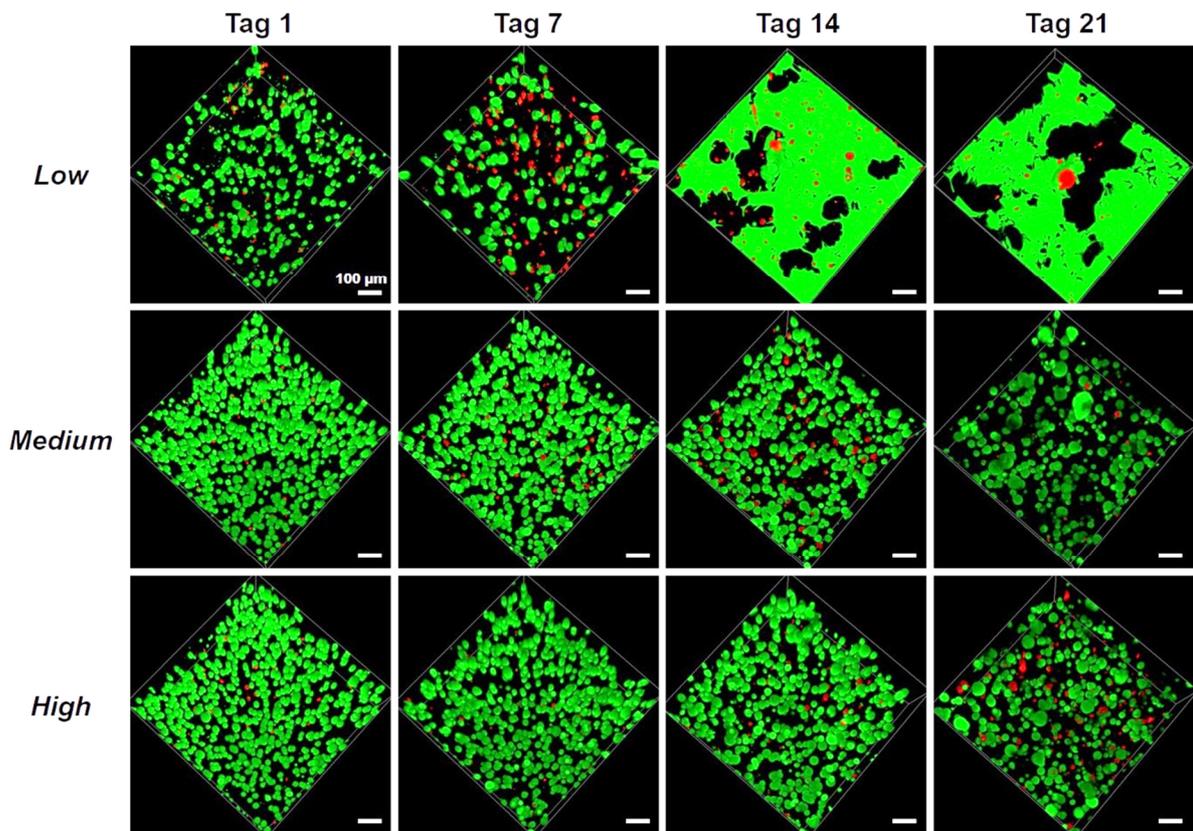


Abbildung 70: Kultivierung und Lebend/Tot-Färbung der im Hydrogel GeINB/GelS low, medium und high eingebetteten HepG2 Zellen (5 % GeINB und GelS mit 0,03 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml). Die Lebend/Tot-Färbung mit 4 μM Calcein-AM (grün, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$) und 0,02 mg/ml Propidiumiodid (rot, $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}650 \text{ nm}$) wurde zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: 300 μm , Schrittgröße 5 μm). Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Leica LasX-Software. Maßstab: 100 μm .

An Tag 1 war für alle drei Hydrogelvarianten ein hoher Anteil lebender HepG2 Zellen zu detektieren. Für die *medium*- und *high*-Varianten der Gele konnte dies auch zu den Zeitpunkten Tag 7 und Tag 14 detektiert werden. Lediglich das GeINB/GelS *low*-Hydrogel wies bereits an Tag 7 eine leicht vermehrte Anzahl nekrotischer Zellen auf. An Tag 14 und Tag 21 war eine durchgehende Krebszellschicht zu detektieren. Dies beruhte vermutlich auf dem Effekt der Instabilität des Hydrogels. So begann dieses bereits an Tag 7 sich aufzulösen und war an Tag 14 und 21 komplett abgebaut, sodass die verbleibenden Zellen am Boden des μ -Slides anwuchsen und eine durchgehende Zellschicht bildeten. Für die *medium*- und *high*-Varianten der Gele wurden nach 21-tägiger Kultivierung eine Zunahme nekrotischer Zellen festgestellt. Die Morphologie der Krebszellen änderte sich im Kultivierungszeitraum nur gering. Die zu Beginn vereinzelt vorliegenden HepG2 Zellen lagerten sich im Verlauf der Kultivierung zu größeren sphäroidartigen Zellclustern zusammen. Für eine genauere Charakterisierung der Viabilitäten wurde der Anteil lebender und toter Zellen in allen Z-Stack Ebenen mit einer Software

zur Bildauswertung bestimmt und daraus die Zellviabilität zu den verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Diese sind in Abbildung 71 dargestellt.

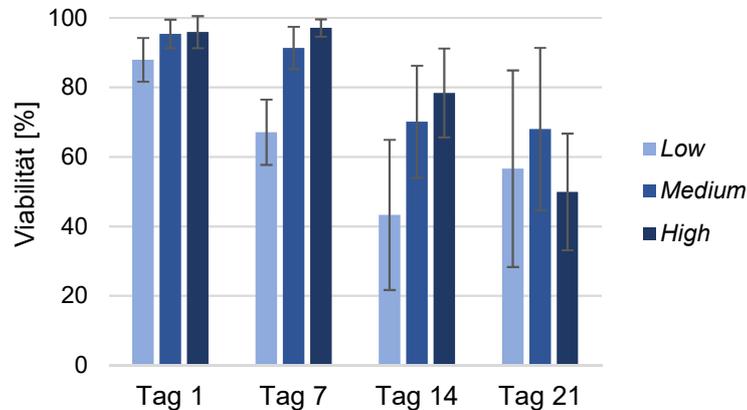


Abbildung 71: Viabilitäten der eingekapselten HepG2 Zellen in den GelNB/GelS-Hydrogelen low, medium und high über einen Kultivierungszeitraum von 21 Tagen.

Wie bereits auf den rekonstruierten 3D-Bildern zu erkennen war, lag die Viabilität zu Beginn der Kultivierung für alle drei Varianten bei über 86 %. Somit konnte nur eine schwache Auswirkung des Vernetzungsprozesses auf die Viabilität der Krebszellen detektiert werden. Da sich das *low*-Gel bereits ab Tag 7 aufzulösen begann, sank die Viabilität kontinuierlich ab. Die Viabilitäten der eingekapselten Krebszellen in den *medium*- und *high*-Gelen sanken ab Kultivierungstag 14 ab, lagen jedoch an Tag 21 noch bei über 50 %. Die gleichmäßige Verteilung der Zellen in allen Gelebenen wurde durch eine Tiefenfärbung der 3D-Bilder überprüft. Diese wurde mit der Leica-Software LasX erstellt und ist in Abbildung 72 dargestellt. Bis auf die *low*-Variante konnte zu allen Zeitpunkten eine gleichmäßige Verteilung der HepG2 Zellen in den 3D-Gelen detektiert werden. Das GelNB/GelS *low*-Gel wies nur eine Stabilität über 7 Tage auf und löste sich anschließend komplett auf, wodurch die enthaltenen Krebszellen auf dem Boden des μ -Slides anwuchsen und eine zusammenhängende Zellschicht ausbildeten.

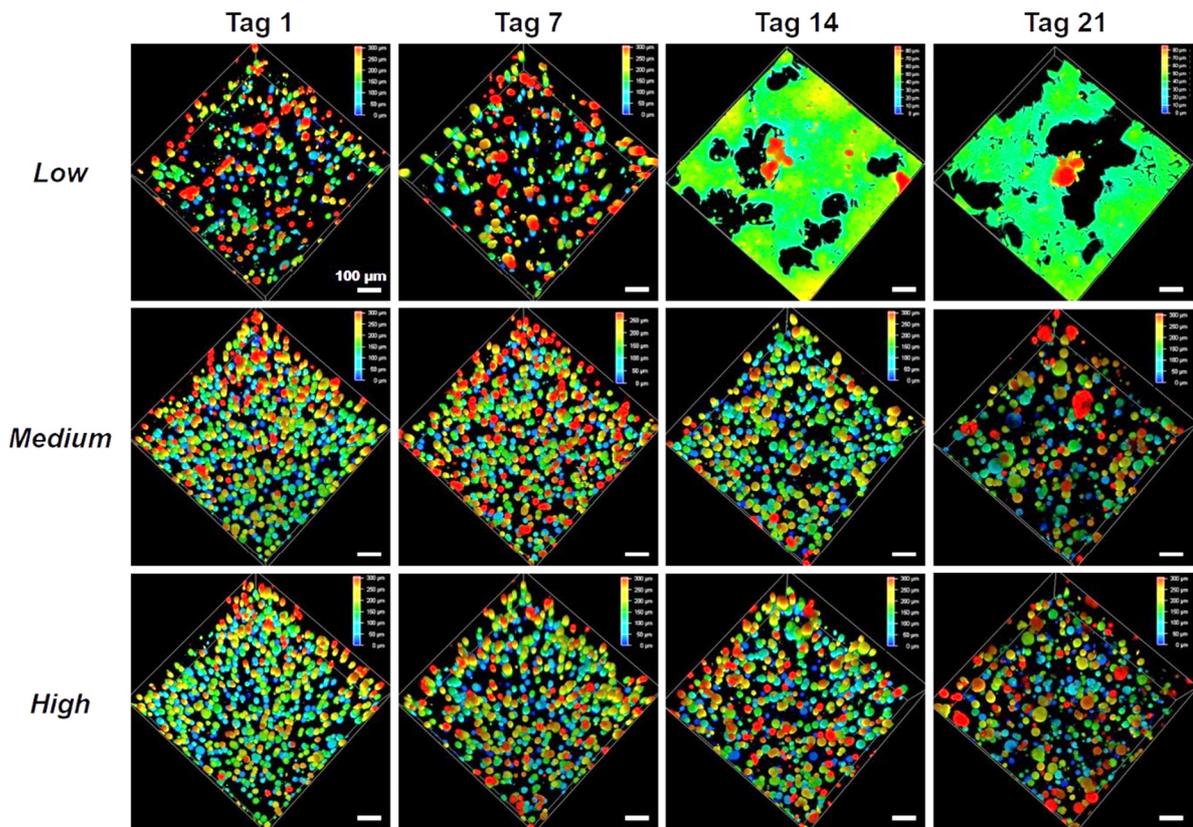


Abbildung 72: Tiefenfärbung der im Hydrogel GelNB/GelS low, medium und high eingebetteten HepG2 Zellen (5 % GelNB und GelS mit 0,03 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: 300 μm , Schrittgröße 5 μm). Die 3D-Rekonstruktion und Tiefenfärbung erfolgte mit der Leica LasX-Software. Skalierung der Tiefenfärbung: 50 μm , blau: 0 μm , rot: 300 μm . Maßstab: 100 μm .

Insgesamt konnten für alle untersuchten Hydrogele hohe Viabilitäten an Tag 1 der Kultivierung detektiert werden. Diese lagen für alle Hydrogele in allen Varianten bei ca. 90 %. Somit konnte gezeigt werden, dass sich die lichtinduzierte Vernetzungsreaktion nur gering auf die Viabilität der Krebszellen auswirkte. Über den untersuchten Kultivierungszeitraum wiesen GelMA-V1 und GelNB/GelS die höchsten Viabilitäten auf. Somit erwiesen sich diese Gele als biokompatibel und übten keine toxische Wirkung auf die eingebetteten HepG2 Zellen aus. Die geringe Viabilität der HepG2 in den GelNB/DTT *medium*- und *high*-Gelen an Tag 7 waren durch den möglichen negativen Einfluss durch toxische Effekte des Crosslinkers DTT zu erklären. Für alle vier Hydrogele konnte ein Absinken der Viabilitäten über den Kultivierungszeitraum bis zu Tag 21 detektiert werden. Dies könnte neben der verminderten Gelstabilität nach 21 Tagen auch auf einem zusätzlichen Beschädigen der Gele bei den Mediumwechseln beruhen. Durch das starke Quellen der Gele in den μ -Slides war es zudem schwierig, die Zellen mit ausreichend neuem Kulturmedium zu versorgen. Auch dies könnte sich negativ auf die Viabilität der

Zellen ausgewirkt haben. Die Tiefenfärbung der 3D-Bilder zeigte für alle Hydrogele eine gleichmäßige Verteilung der Leberkrebszellen innerhalb der Hydrogele. Anhand dieser Ergebnisse konnte am Beispiel der HepG2 Zellen eine hohe Biokompatibilität der untersuchten Hydrogele nachgewiesen werden. Ein Sinken der Viabilitäten nach 14 Tagen war auf Abbaueffekte des Gels und eine nicht ausreichende Versorgung mit neuem Kulturmedium zurückzuführen.

4.5.1.2 3D-Einbettung primärer Fibroblasten

Zur Einschätzung der Biokompatibilität der vier verschiedenen Hydrogele GelMA-V1, GelMA-V2, GelNB/DTT und GelNB/GelS gegenüber primären Zellen wurden humane Hautfibroblasten in die Gele eingekapselt. Diese sind im Gegensatz zu Krebszelllinien nicht immortalisiert und werden aus frisch isolierten Zellen angezüchtet, die häufig die metabolische Kapazität des Ursprungsgewebes aufweisen.²¹⁵ Die verwendeten Hautfibroblasten NHDF sind größer als die Leberkrebszellen und zeichnen sich durch eine spindelförmige Morphologie und eine starke Netzwerkbildung untereinander aus.²⁶⁰

Durch das Mischen der Zellen mit den flüssigen Photopolymerlösungen wurde gewährleistet, dass die Zellen nach der Vernetzung in der 3D-Struktur eingekapselt sind.

GelMA-V1

Zunächst wurde die Biokompatibilität des GelMA-V1-Hydrogels in den Varianten *low*, *medium* und *high* auf den NHDF in Kollaboration mit der Masterstudentin Xenia Kempter (AK Schepers, Institut für Funktionelle Grenzflächen, KIT) untersucht.¹⁸⁷ Die Ergebnisse der Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM (4 μM) und Propidiumiodid (0,02 mg/ml) zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 sind in Abbildung 73 dargestellt. Mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica TCE SPE) wurden Z-Stack Aufnahmen der Gele mit einer Höhe von 300 μm aufgezeichnet und anschließend mit der Software Leica LasX in 3D-Bilder rekonstruiert.

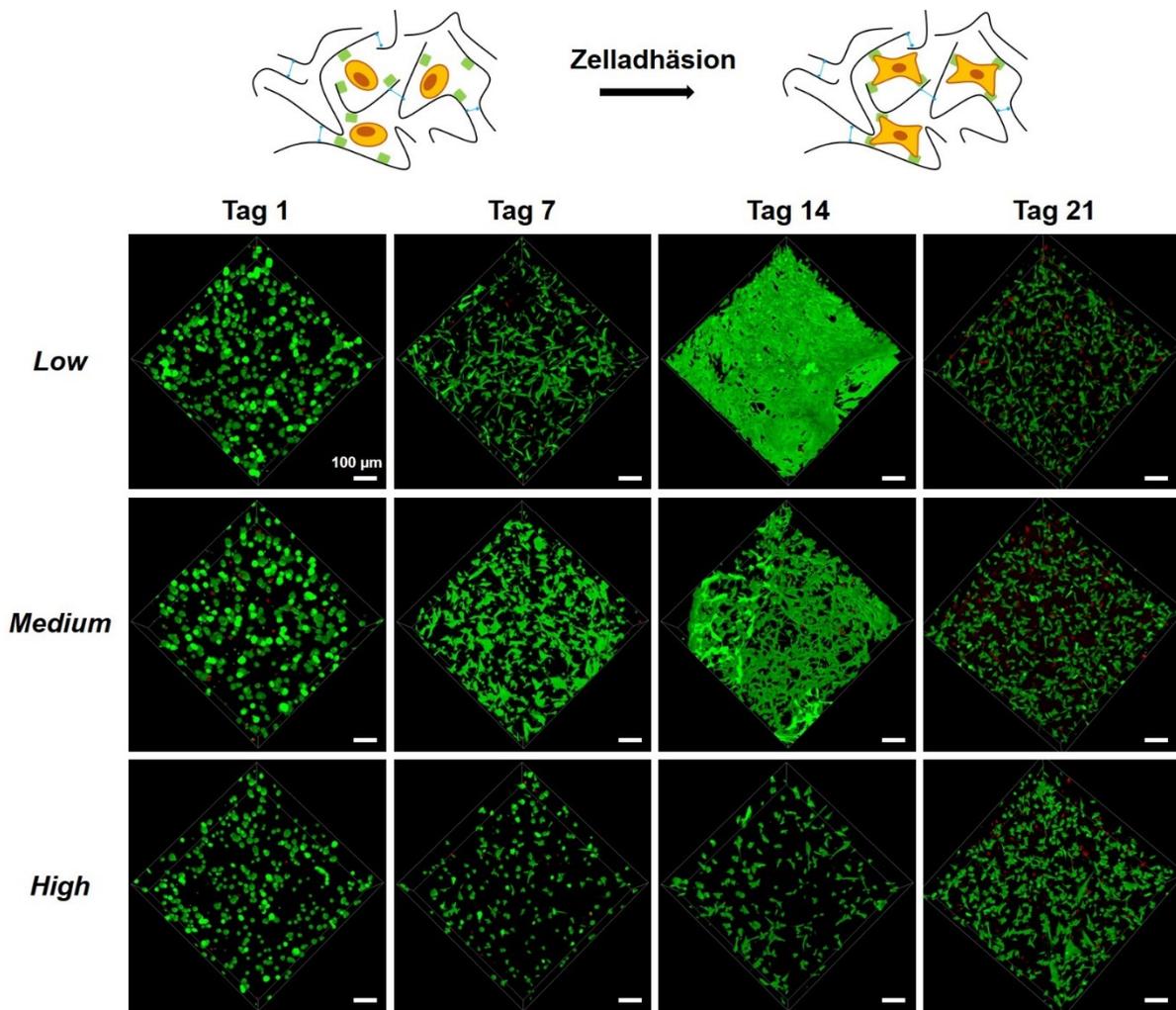


Abbildung 73 Kultivierung und Lebend/Tot-Färbung der im Hydrogel GelMA-V1 low, medium und high eingebetteten NHDF (5 % GelMA-V1 mit 0,3 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml). Die Lebend/Tot-Färbung mit $4 \mu\text{M}$ Calcein-AM (grün, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$) und $0,02 \text{ mg/ml}$ Propidiumiodid (rot, $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}650 \text{ nm}$) wurde zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: $300 \mu\text{m}$, Schrittgröße $5 \mu\text{m}$). Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Leica LasX-Software. Maßstab: $100 \mu\text{m}$. Mit zunehmender Kultivierungsdauer kam es zur Adhäsion der Zellen and die Zellbindedomänen der Gelatine und somit zur Ausrichtung der Zellen innerhalb der Hydrogele.

Für alle untersuchten Varianten ließ sich über den Kultivierungszeitraum von 21 Tagen ein hoher Anteil grüner und damit lebender Zellen nachweisen. Auch die Zellmorphologie der Fibroblasten änderte sich. So wiesen die NHDF an Tag 1 in allen Hydrogelvarianten eine runde Zellstruktur auf. An Tag 7 zeigten sich bereits erste Veränderungen. Eine Elongation und Ausrichtung der Fibroblasten war besonders in den low- und medium-Gelen zu erkennen, fand aber auch vereinzelt in den high-Hydrogelen statt. Nach 14 Tagen konnte in dem low- und medium-Gel ein dichtes interzelluläres Netzwerk detektiert werden. Die Gele, welche an Tag

21 gefärbt wurden, zeigten auch eine Elongation und Ausrichtung der NHDF, jedoch keine so starke Netzwerkbildung, wie sie an Tag 14 vorhanden war. Zur quantitativen Bestimmung der Viabilitäten wurde der Anteil lebender und toter Zellen mit Hilfe einer Software zur Bildauswertung in allen Ebenen der aufgenommenen Z-Stacks bestimmt. Die daraus ermittelten Viabilitäten der NHDF sind in Abbildung 74 dargestellt.

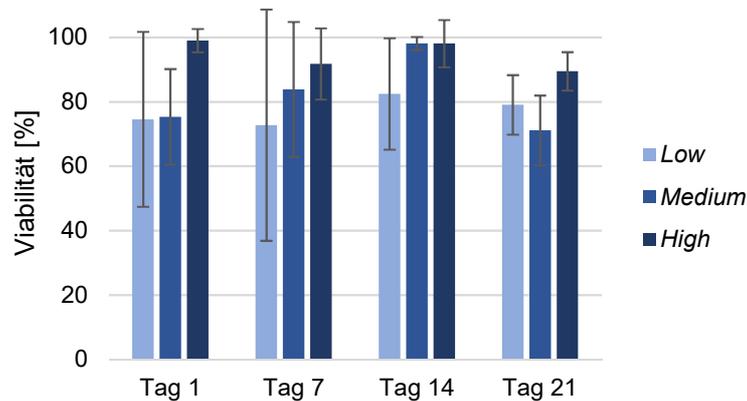


Abbildung 74: Viabilitäten der eingekapselten NHDF in den GelMA-V1-Hydrogelen low, medium und high über einen Kultivierungszeitraum von 21 Tagen.

An Tag 1 lagen die Viabilitäten der NHDF für die *low*- und *medium*-Variante des Gels bei über 70 %. Für die *high*-Gele lag diese bei knapp 100 %. Der lichtinduzierte Vernetzungsprozess wirkte sich somit nicht signifikant auf die Viabilität der Fibroblasten aus. Auch über den weiteren Kultivierungszeitraum von 21 Tagen lagen die Viabilitäten bei 70 % bis 98 % und sanken im Verlauf der Kultivierung auch nicht signifikant ab. Die gleichmäßige Verteilung der Zellen in allen Gelebenen wurde durch eine Tiefenfärbung der 3D-Bilder überprüft. Diese sind in Abbildung 75 dargestellt. Die Fibroblasten waren in allen Gelebenen gleichmäßig verteilt. Auch die starke interzelluläre Netzwerkbildung an Tag 14 war über die komplette Höhe der Z-Stacks detektierbar. Es war auch keine Verringerung der Gelhöhe zu verzeichnen, sodass selbst an Tag 21 ein Z-Stack mit einer Höhe von 300 μm aufgenommen werden konnte. Die GelMA-V1-Hydrogele erwiesen sich somit in diesem Versuch als sehr stabil.

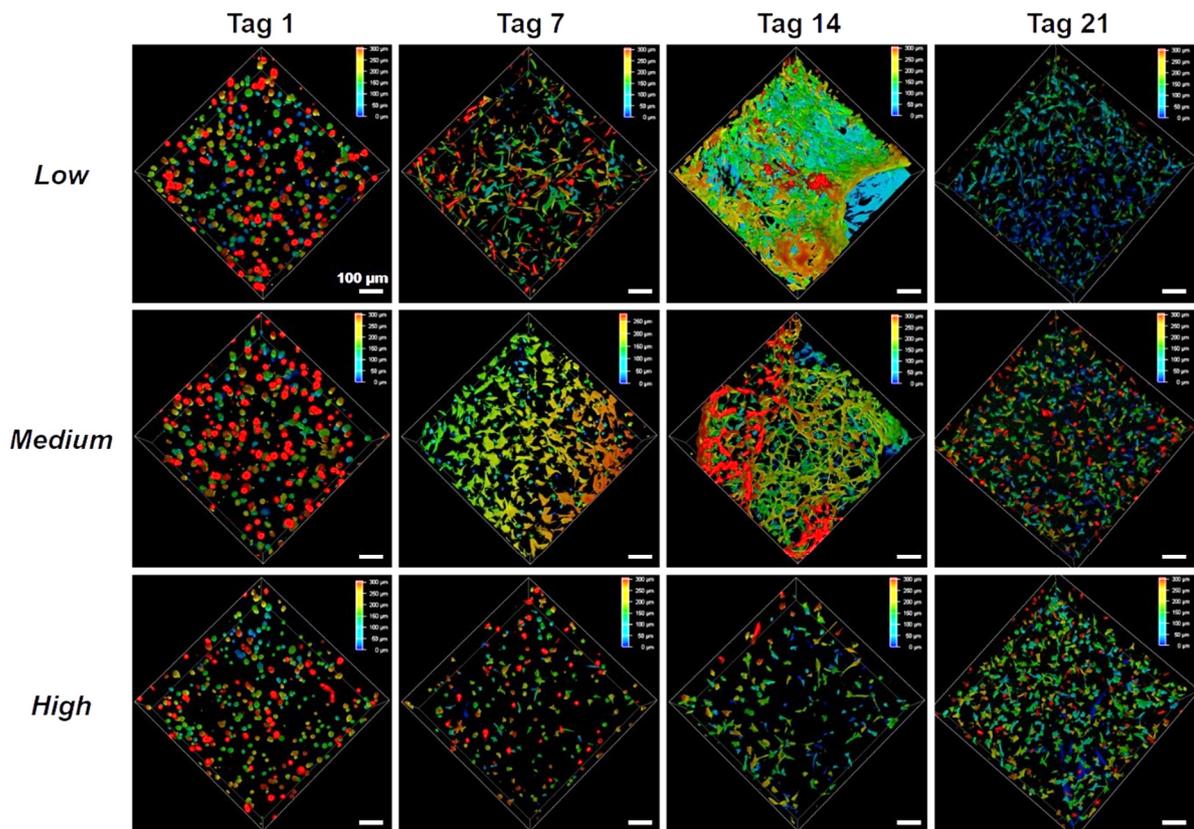


Abbildung 75: Tiefenfarbung der im Hydrogel GelMA-V1 low, medium und high eingebetteten NHDF (5 % GelMA-V1 mit 0,3 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: 300 μm , Schrittgröße 5 μm). Die 3D-Rekonstruktion und Tiefenfarbung erfolgte mit der Leica LasX-Software. Skalierung der Tiefenfarbung: 50 μm , blau: 0 μm , rot: 300 μm . Maßstab: 100 μm .

GelMA-V2

GelMA-V2 unterschied sich im Vernetzungsgrad von GelMA-V1 und wurde ebenfalls hinsichtlich seiner Biokompatibilität gegenüber NHDF untersucht. Die Ergebnisse der Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM (4 μM) und Propidiumiodid (0,02 mg/ml) zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 sind in Abbildung 76 dargestellt. Mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica TCE SPE) wurden Z-Stack Aufnahmen der Gele mit einer Höhe von 300 μm aufgezeichnet und anschließend mit der Software Leica LasX in 3D-Bilder rekonstruiert.

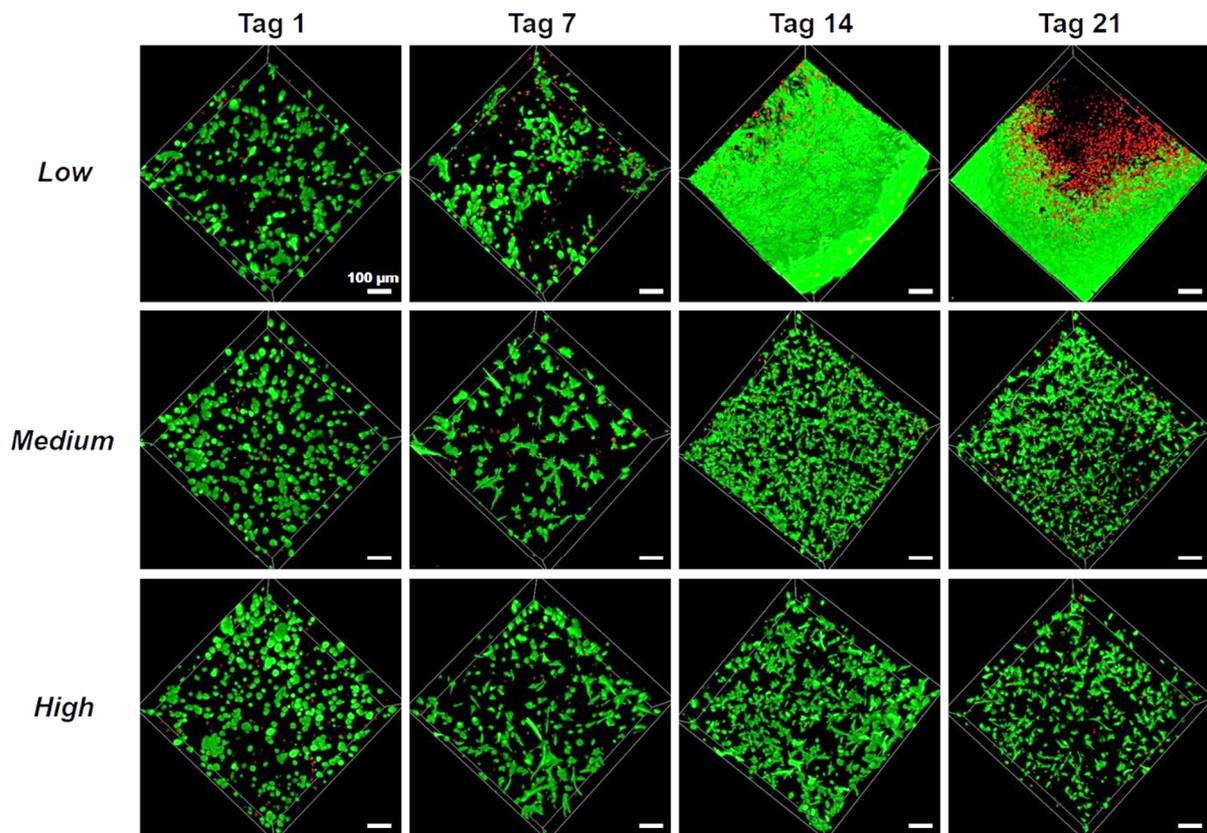


Abbildung 76: Kultivierung und Lebend/Tot-Färbung der im Hydrogel GelMA-V2 low, medium und high eingebetteten NHDF (5 % GelMA-V2 mit 0,3 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml). Die Lebend/Tot-Färbung mit $4 \mu\text{M}$ Calcein-AM (grün, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$) und $0,02 \text{ mg/ml}$ Propidiumiodid (rot, $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}650 \text{ nm}$) wurde zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: $300 \mu\text{m}$, Schrittgröße $5 \mu\text{m}$). Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Leica LasX-Software. Maßstab: $100 \mu\text{m}$. Erstellt in Kollaboration mit T. Göckler.¹⁸⁶

Für alle drei Varianten konnte ein hoher Anteil grüner und damit lebender Zellen über einen Zeitraum von 14 Tagen detektiert werden. Nach 21-tägiger Kultivierung waren im GelMA-V2 low-Hydrogel vermehrt nekrotische Zellen zu erkennen. Auch in diesem Hydrogel änderte sich die Morphologie der NHDF im Verlauf der Kultivierung. Die zu Beginn runden Zellen richteten sich bereits an Tag 7 innerhalb des Hydrogels aus. Für die low-Variante waren erste Zellausläufer bereits an Tag 1 zu detektieren. An Tag 14 wies dieses dann ein dichtes interzelluläres Netzwerk auf, welches in manchen Bereichen auch noch an Tag 21 detektiert werden konnte. Auch in der medium- und high-Variante war zwar eine deutliche Elongation der NHDF zu detektieren, eine gleichmäßige Netzwerkbildung fand jedoch nicht statt. Zur quantitativen Bestimmung der Viabilitäten wurde der Anteil lebender und toter Zellen mit Hilfe einer Bildauswertungs-Software in allen Gelebenen bestimmt und daraus die Viabilitäten ermittelt. Diese sind in Abbildung 77 dargestellt.

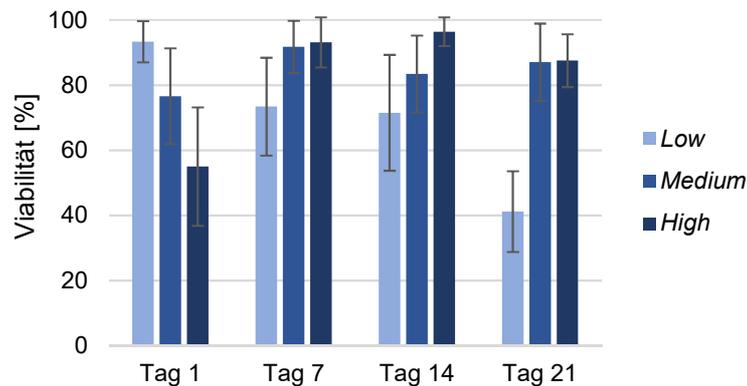


Abbildung 77: Viabilitäten der eingekapselten NHDF in den GelMA-V2-Hydrogelen *low*, *medium* und *high* über einen Kultivierungszeitraum von 21 Tagen.

Die Viabilitäten der NHDF in den GelMA-V2 *low*- und *medium*-Hydrogelen lagen an Tag 1 bei über 78 %. Bei der *high*-Variante wurde dagegen eine deutlich geringere Viabilität von 55 % detektiert. Ein möglicher Grund für die geringe Viabilität könnte darauf beruhen, dass dieses Gel zuletzt vernetzt wurde und dadurch die Zellen länger der nicht-vernetzten Photopolymerlösung und dem toxischen Photoinitiator LAP ausgesetzt waren. Nach einer Kultivierungsdauer von 7 Tagen lag die Viabilität der Zellen in allen Hydrogelvarianten wieder über 70 %. Dies konnte auch für die Zeitpunkte Tag 14 und Tag 21 detektiert werden. Einzig die Zellviabilität im *low*-Hydrogel sank von Tag 1 bis Tag 21 von über 90 % auf ca. 40 % ab. Durch die starke Zellausbreitung war vermutlich kein ausreichender Platz mehr für alle Zellen vorhanden, sodass ein Teil der Zellen im Gel abstarb. Ein weiterer Grund dafür könnte die Gelstabilität sein. So wurde dieses im Verlauf der Kultivierung immer weiter abgebaut und löste sich auf, wodurch die Zellen aus der Struktur herausgelöst wurden. Dies wurde auch auf den Tiefenfärbungen der Bilder deutlich. Diese sind in Abbildung 78 dargestellt. An Tag 21 hatte sich das *low* Gel bereits so stark aufgelöst, dass lediglich eine Z-Stack Höhe von 140 μm erreicht wurde. In den anderen Hydrogelvarianten und zu den anderen Zeitpunkten lagen die NHDF jedoch gleichmäßig über alle Gelebenen verteilt vor. Auch die starke Netzwerkbildung der Fibroblasten im *low*-Hydrogel an Tag 14 verlief über alle Gelebenen hinweg.

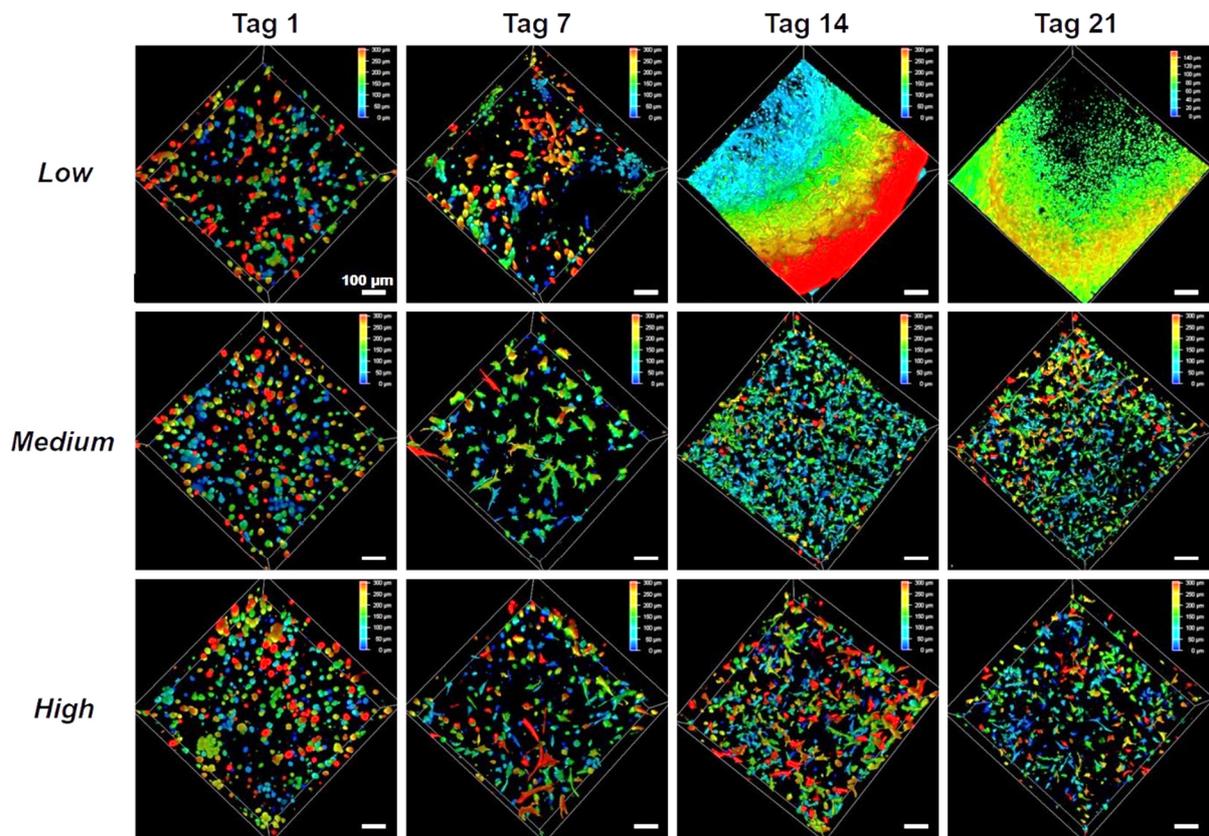


Abbildung 78: Tiefenfarbung der im Hydrogel GelMA-V2 low, medium und high eingebetteten NHDF (5 % GelMA-V2 mit 0,3 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: 300 μm , Schrittgröße 5 μm). Die 3D-Rekonstruktion und Tiefenfarbung erfolgte mit der Leica LasX-Software. Skalierung der Tiefenfarbung: 50 μm , blau: 0 μm , rot: 300 μm . Maßstab: 100 μm .

GeINB/DTT

In einem nächsten Schritt wurde die Biokompatibilität der drei GeINB/DTT-Hydrogele *low*, *medium* und *high* anhand der eingebetteten Fibroblasten über einen Zeitraum von 21 Tagen untersucht. Die Ergebnisse der Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM (4 μM) und Propidiumiodid (0,02 mg/ml) sind in Abbildung 79 dargestellt. Mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica TCE SPE) wurden Z-Stack Aufnahmen der Gele mit einer Höhe von 300 μm aufgezeichnet und anschließend mit der Software Leica LasX in 3D-Bilder rekonstruiert.

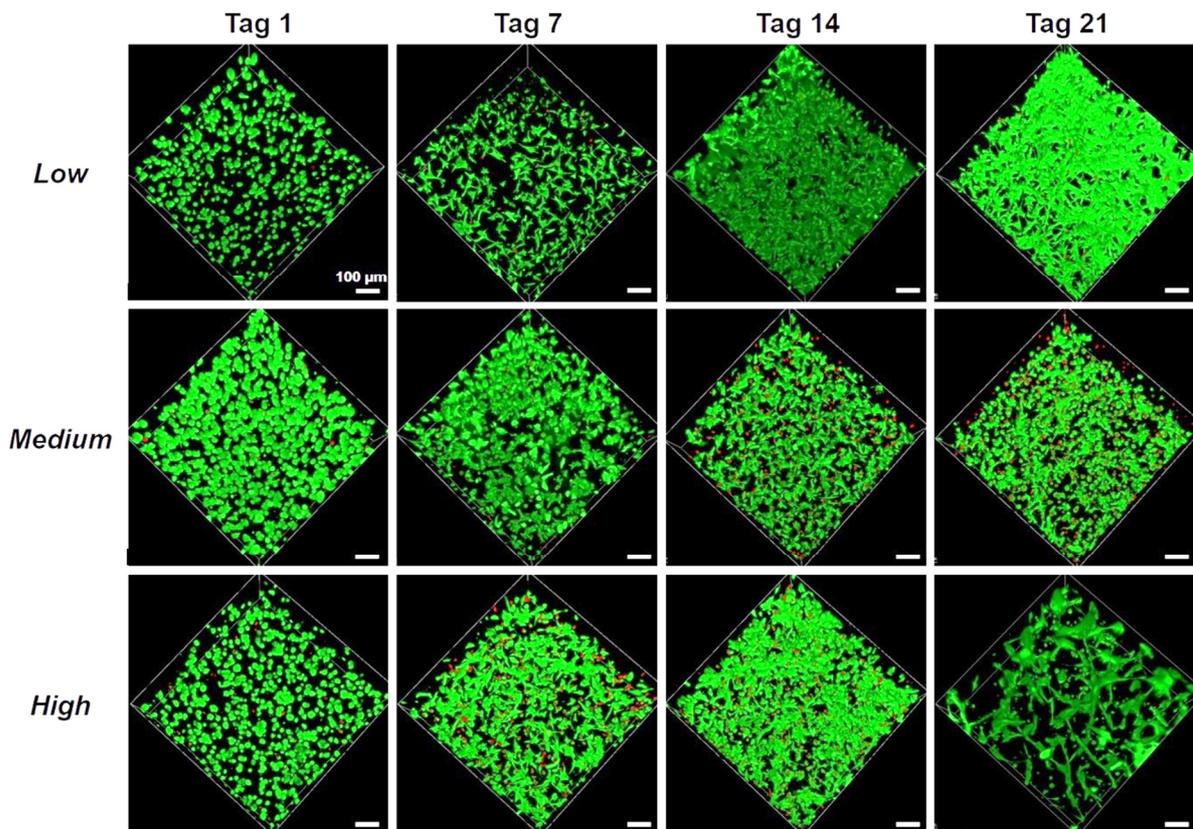


Abbildung 79: Kultivierung und Lebend/Tot-Färbung der im Hydrogel GeINB/DTT low, medium und high eingebetteten NHDF (5 % GeINB mit 5,4 mM, 8mM oder 15 mM DTT, 0,03 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml). Die Lebend/Tot-Färbung mit $4 \mu\text{M}$ Calcein-AM (grün, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$) und $0,02 \text{ mg/ml}$ Propidiumiodid (rot, $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}650 \text{ nm}$) wurde zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: $300 \mu\text{m}$, Schrittgröße $5 \mu\text{m}$). Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Leica LasX-Software. Maßstab: $100 \mu\text{m}$.

In den rekonstruierten 3D-Bildern waren über den untersuchten Zeitraum von 21 Tagen viele grüne und damit lebende Zellen in allen drei Hydrogelvarianten zu erkennen. Auch eine Ausrichtung und Elongation der NHDF konnte ab Tag 7 in den drei Gelvarianten *low*, *medium* und *high* detektiert werden. Nach 14-tägiger Kultivierung in den Gelen bildeten die Zellen ein interzelluläres Netzwerk aus. Dies war besonders im GeINB/DTT *low*-Hydrogel zu beobachten. So durchzog das Netzwerk nach 21 Tagen das komplette Hydrogel. Aber auch bei den beiden Varianten *medium* und *high* waren an Tag 21 Netzwerkbildungen zu detektieren. Für die quantitative Viabilitätsbestimmung wurde der Anteil lebender und nekrotischer Zellen in allen Z-Stack Aufnahmen mit Hilfe einer Bildauswertungs-Software bestimmt und daraus die Zellviabilitäten bestimmt. Diese sind in Abbildung 80 dargestellt.

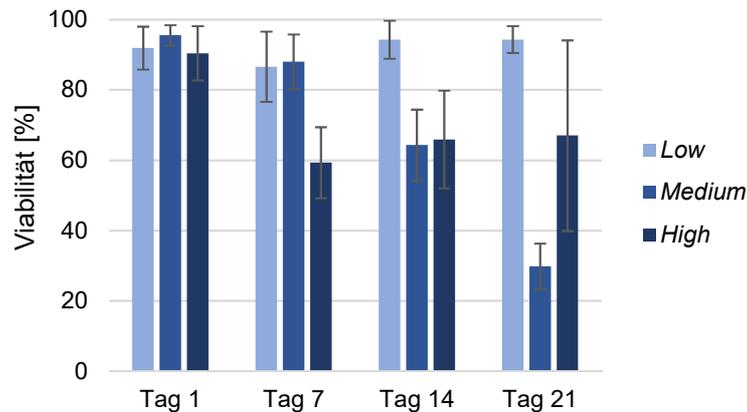


Abbildung 80: Viabilitäten der eingekapselten NHDF in den GeINB/DTT-Hydrogelen *low*, *medium* und *high* über einen Kultivierungszeitraum von 21 Tagen.

Nach Tag 1 lagen die Viabilitäten für alle drei Varianten bei über 90 %. Somit wirkte sich der lichtinduzierte Vernetzungsprozess nur minimal auf die Viabilität der Fibroblasten aus. Die Viabilität der in GeINB/DTT *low* eingekapselten NHDF lag über den gesamten Kultivierungszeitraum bei ca. 90 %. Für GeINB/DTT *medium* und *high* sank die Viabilität ab Tag 14 bzw. 7 und lag an Tag 21 bei 30 % für die *medium*-Variante und 68 % für die *high*-Variante. Ein möglicher Grund für das Absinken der Viabilität könnte der für die Vernetzung genutzte Crosslinker DTT sein. Da dieser eine starke toxische Wirkung auf Zellen ausübt, könnte die Zellviabilität sinken, falls nicht alle DTT Moleküle während der Vernetzung abreagierten und innerhalb der Gelstruktur vorlagen. Um die gleichmäßige Verteilung der Zellen in allen Hydrogelschichten zu charakterisieren, wurden mit der Software Leica LasX eine Tiefenfärbung der 3D-Bilder durchgeführt. Diese sind in Abbildung 81 dargestellt. Für alle drei Hydrogelvarianten war eine gleichmäßige Verteilung der NHDF innerhalb der Hydrogele zu detektieren. Auch für das GeINB/DTT *low* Gel wurde eine Verringerung der Gelhöhe ab Tag 7 verzeichnet. So konnten für dieses Gel lediglich Z-Stacks mit einer Höhe von 120 μm aufgenommen werden.

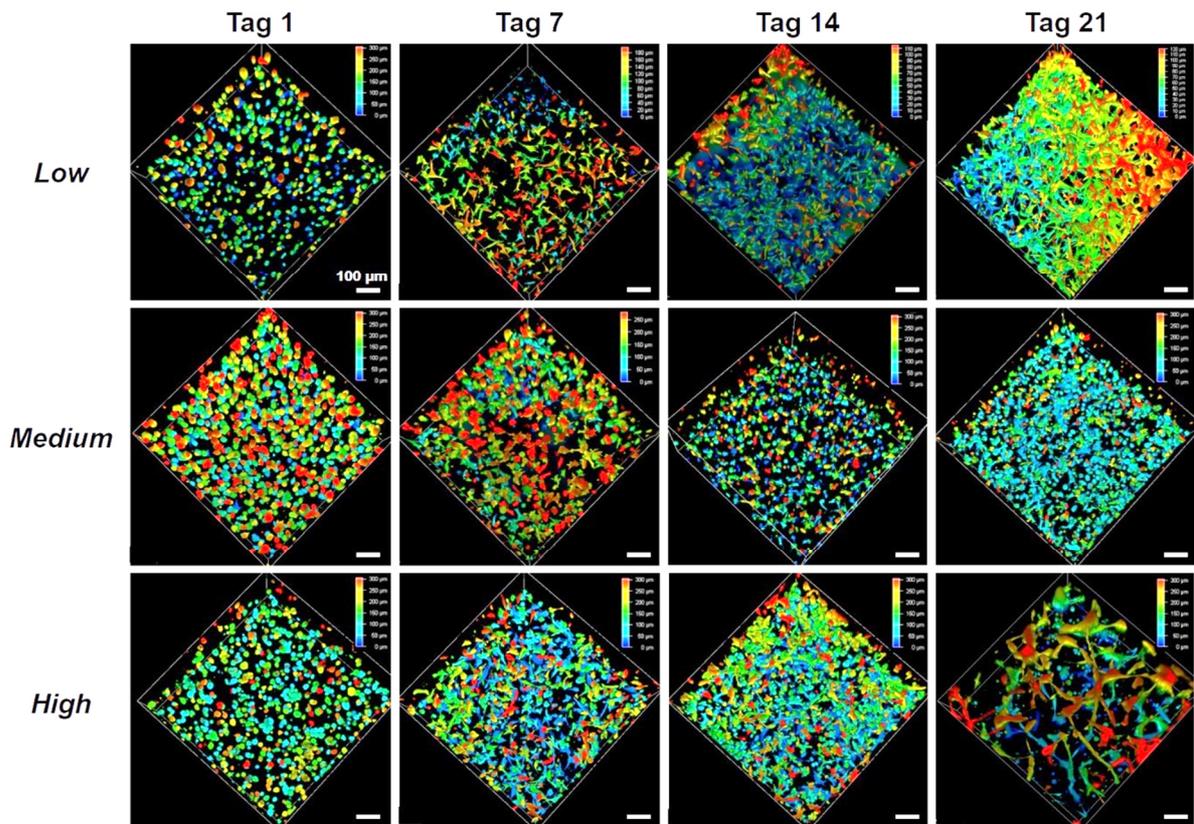


Abbildung 81: Tiefenfarbung der im Hydrogel GeINB/DTT low, medium und high eingebetteten NHDF (5 % GeINB mit 5,4 mM, 8mM oder 15 mM DTT, 0,03 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: 300 μm , Schrittgröße 5 μm). Die 3D-Rekonstruktion und Tiefenfarbung erfolgte mit der Leica LasX-Software. Skalierung der Tiefenfarbung: 50 μm , blau: 0 μm , rot: 300 μm . Maßstab: 100 μm .

GeINB/GelS

In einem nächsten Schritt wurde die Biokompatibilität der drei neuartigen GeINB/GelS-Hydrogele low, medium und high anhand der eingebetteten NHDF über einen Zeitraum von 21 Tagen untersucht. Die Ergebnisse der Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM (4 μM) und Propidiumiodid (0,02 mg/ml) sind in Abbildung 82 dargestellt. Mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica TCE SPE) wurden Z-Stack Aufnahmen der Gele mit einer Höhe von 300 μm aufgezeichnet und anschließend mit der Software Leica LasX in 3D-Bilder rekonstruiert.

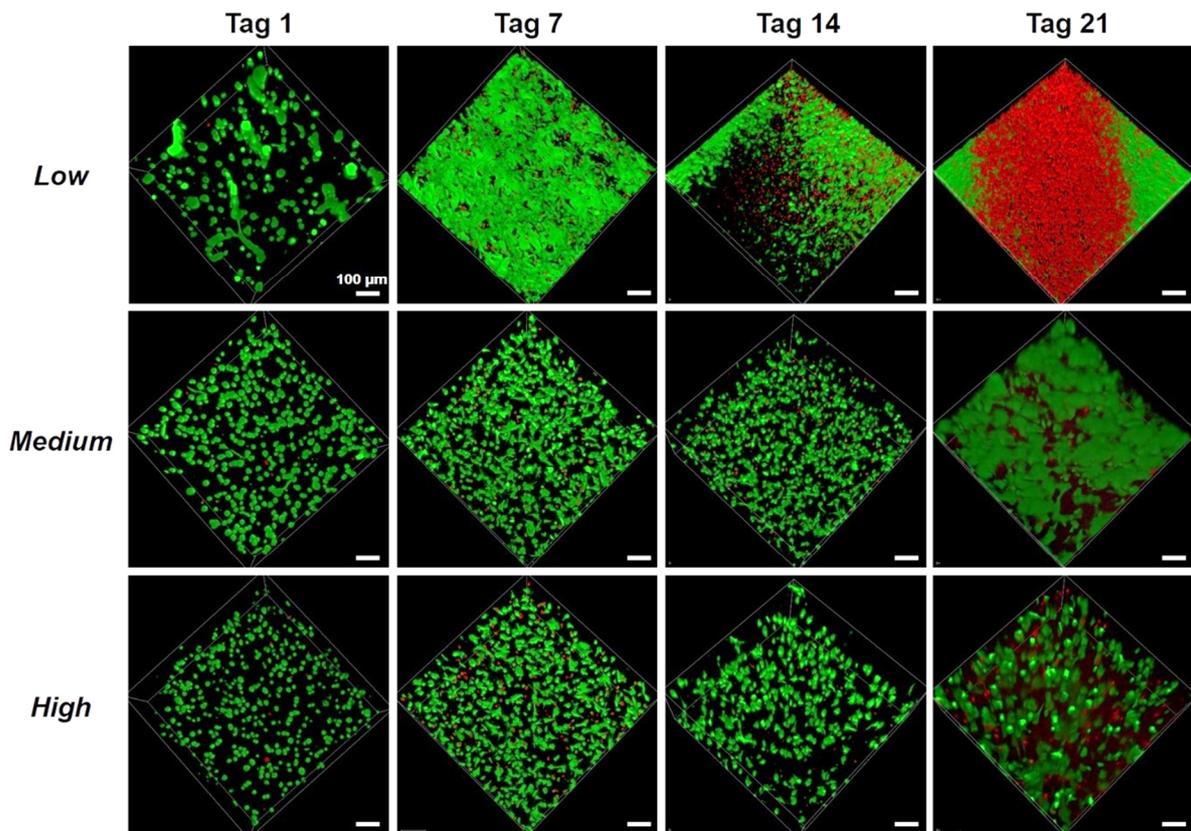


Abbildung 82: Kultivierung und Lebend/Tot-Färbung der im Hydrogel GeINB/GeIS low, medium und high eingebetteten NHDF (5 % GeINB und GeIS mit 0,03 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml). Die Lebend/Tot-Färbung mit $4 \mu\text{M}$ Calcein-AM (grün, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$) und $0,02 \text{ mg/ml}$ Propidiumiodid (rot, $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}650 \text{ nm}$) wurde zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: $300 \mu\text{m}$, Schrittgröße $5 \mu\text{m}$). Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Leica LasX-Software. Maßstab: $100 \mu\text{m}$.

Anders als in den zuvor untersuchten Hydrogelen konnten bei den GeINB/GeIS low- und medium-Gelen bereits an Tag 1 Fibroblasten detektiert werden, die sich innerhalb des Hydrogels auszurichten begannen. An Tag 7 durchzog bereits ein komplettes interzelluläres Netzwerk das low-Hydrogel. Und auch in den beiden anderen Varianten war eine deutliche Elongation der NHDF zu detektieren. Zusätzlich waren von Tag 1 bis Tag 7 kaum rote und damit nekrotische Zellen zu detektieren. Nach 21-tägiger Kultivierung lag im low-Hydrogel ein sehr hoher Anteil nekrotischer Zellen vor. Dies wurde auf die zunehmende Instabilität des Gels zurückgeführt. So löste sich dieses bereits ab Tag 7 langsam auf. Für die medium- und high-Gele konnte ein solcher Effekt nicht beobachtet werden; die Zellen durchzogen mit ihrem Netzwerk auch an Tag 21 die beiden Hydrogele. Zusätzlich könnte durch die starke Ausbreitung und Proliferation der Zellen in dem Hydrogel die Nährstoffversorgung zu gering gewesen sein, sodass

ein Großteil der NHDF abstarb. Für eine quantitative Bestimmung der Viabilität wurde der Anteil lebender und toter Zellen in allen Z-Stack Ebenen bestimmt und daraus die Zellviabilitäten ermittelt. Diese sind in Abbildung 83 dargestellt.

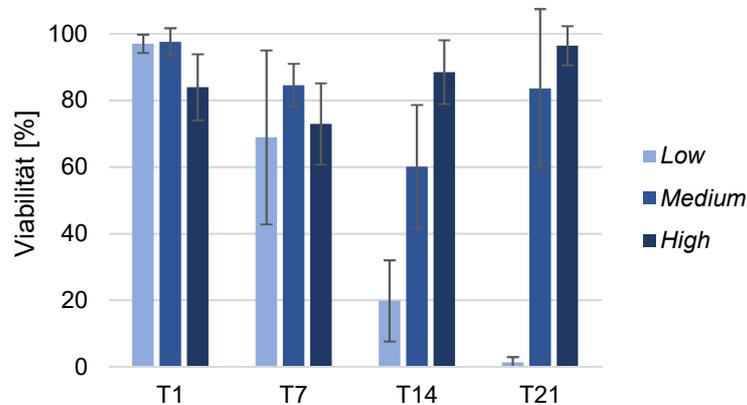


Abbildung 83: Viabilitäten der eingekapselten NHDF in den GeINB/GeIS-Hydrogelen low, medium und high über einen Kultivierungszeitraum von 21 Tagen.

Die hohen Viabilitäten an Tag 1, welche zwischen 83 % und 97 % lagen, zeigten, dass sich der lichtinduzierte Vernetzungsprozess nur sehr gering auf die Viabilität der eingekapselten Zellen auswirkte. An Tag 7 sanken die Viabilitäten der NHDF Zellen in allen drei Hydrogelen auf ca. 70 % leicht ab. Die Viabilität der *low*-Hydrogele sank im weiteren Verlauf auf 2 % ab. Da dieses Gel den geringsten Vernetzungsgrad der drei Varianten aufwies, konnte dieses durch enzymatische Aktivität leichter abgebaut werden. Die enthaltenen Zellen wurden daraufhin aus der Struktur herausgelöst. Aufgrund von Platz- und Nährstoffmangel könnte die Viabilität dann stark abgesunken sein. Die Viabilitäten der eingekapselten NHDF in den *medium*- und *high*-Gelen lagen auch an Tag 21 bei über 80 %. Somit erwies sich das GeINB/GeIS-Hydrogel als biokompatibel und übte keine toxische Wirkung auf die eingebetteten NHDF aus. Die Instabilität des GeINB/GeIS *low*-Hydrogels wurde auch durch die Tiefenfärbung verdeutlicht. Diese ist in Abbildung 84 dargestellt. Bereits ab Tag 7 nahm die Gelhöhe ab, sodass lediglich Z-Stack Aufnahmen mit einer Höhe von 120 μm bis 150 μm angefertigt werden konnten. Die Tiefenfärbungen der Zellen zeigten jedoch eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in allen aufgenommenen Gelebenen. Auch die Netzwerke der NHDF untereinander konnten in allen Hydrogelebenen detektiert werden.

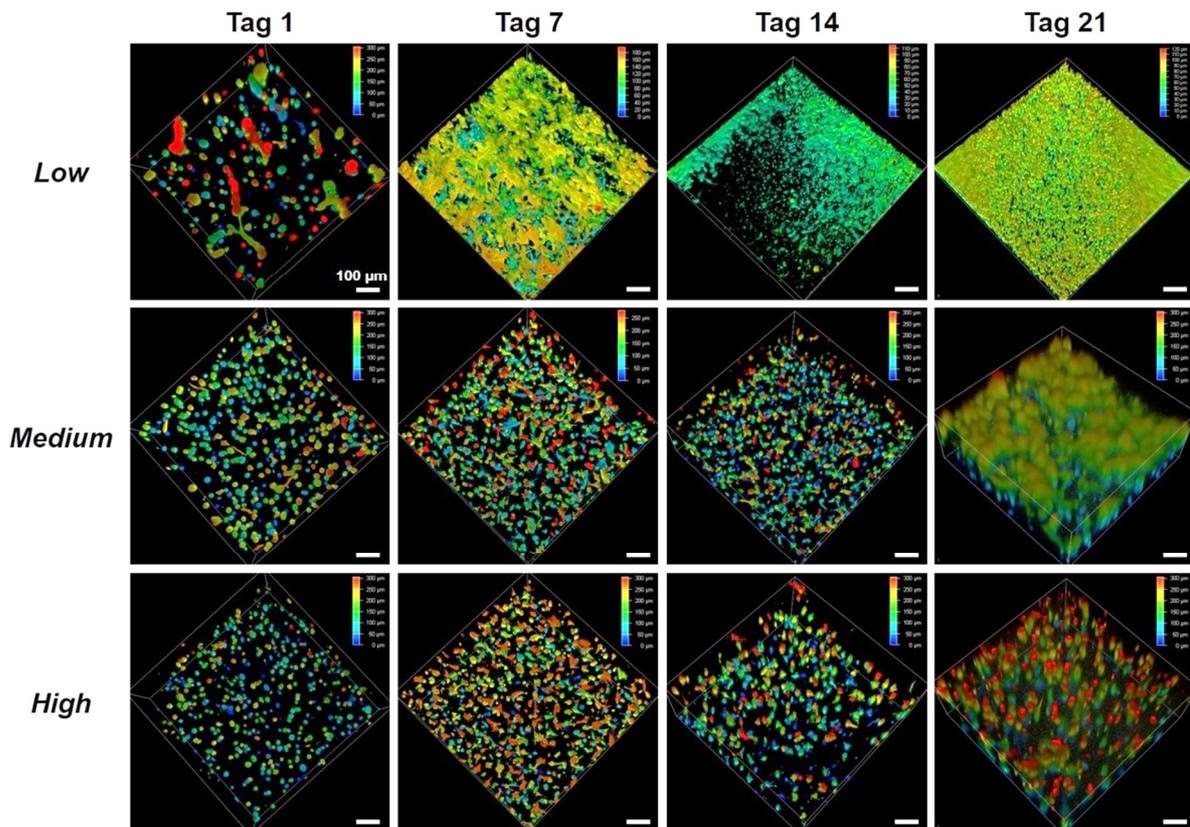


Abbildung 84: Tiefenfärbung der im Hydrogel GelNB/GelS low, medium und high eingebetteten NHDF (5 % GelNB und GelS mit 0,03 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: 300 µm, Schrittgröße 5 µm). Die 3D-Rekonstruktion und Tiefenfärbung erfolgte mit der Leica LasX-Software. Skalierung der Tiefenfärbung: 50 µm, blau: 0 µm, rot: 300 µm. Maßstab: 100 µm.

Insgesamt konnten für die vier verschiedenen Hydrogeltypen an Tag 1 nach der Einkapselung Viabilitäten von über 70 % detektiert werden. Somit wirkte sich der lichtinduzierte Vernetzungsprozess nur gering auf die Viabilität der NHDF aus. Über den Kultivierungszeitraum von 21 Tagen wiesen die GelMA-V1, GelMA-V2 und GelNB/GelS-Hydrogele mit Ausnahme der low-Varianten hohe Viabilitäten von ca. 80 % auf. Somit erwiesen sich alle untersuchten Gelatinebasierten Hydrogele als biokompatibel mit primären Hautfibroblasten. Die teilweise starke Abnahme der Zellviabilität in den low-Hydrogelen könnten durch die geringe Stabilität und Festigkeit der Gele erklärt werden. Diese wiesen in den rheologischen Charakterisierungen Werte zwischen 50 Pa und 100 Pa für die Speichermodule auf (siehe Kapitel 4.4.5). Die damit sehr weichen Hydrogele verfügten über den geringsten Vernetzungsgrad, wodurch auch ein enzymatischer Abbau schneller zur Degradation des Gels führen könnte. Die geringen Viabilitätswerte der GelNB/DTT medium- und high-Hydrogele könnten durch die toxische Wirkung des Crosslinkers DTT erklärt werden. Falls nicht alle DTT Moleküle bei der Vernetzung des Hydrogels abreagierten, könnten diese die Viabilität der eingekapselten Zellen herabgesetzt

haben. Die Tiefenfärbung der 3D-Bilder zeigte für alle Hydrogele eine gleichmäßige Verteilung der Hautfibroblasten innerhalb der Hydrogele. Auch eine Veränderung in der Zellmorphologie war in allen vier Hydrogelvarianten zu detektieren. So war eine Elongation und Netzwerkbildung der NHDF innerhalb der Hydrogele zu beobachten. Besonders schnell lief dieser Prozess in den *low*-Varianten der Hydrogele ab. Ein Grund dafür könnte der geringe Vernetzungsgrad dieser Gele sein. Durch eine geringe Vernetzung innerhalb des Gels entstehen größere Poren in der Gelstruktur. Diese könnten den Zellen ausreichend Platz für die Zellmigration, Elongation und Netzwerkbildung bieten. Zusätzlich wäre eine Remodellierung der Umgebungsmatrix für die NHDF in den *low*-Hydrogelen einfacher, da diese durch die größeren Poren flexibler sind und weniger Bindungen enzymatisch gespalten werden müssten. In den *medium*- und *high*-Gelen war der Vernetzungsgrad höher und damit das gebildete Gelnetzwerk engmaschiger und unflexibler. Somit bräuchten die eingekapselten Zellen für eine Remodellierung deutlich länger. Dieser Effekt konnte auch von Nichol *et al.* und Greene *et al.* bereits festgestellt werden.^{113,261}

In Abbildung 85 sind die Ergebnisse der Lebend/Tot-Färbungen der beiden Hydrogele GelMA-V2 *low* und GelNB/GelS *low* vergleichend dargestellt. Bei beiden Gelen war eine Ausrichtung der Zellen zu erkennen. Im GelNB/GelS-Hydrogel konnten jedoch bereits an Tag 1 erste elongierte NHDF detektiert werden. Nach 7 Tagen bildeten die Zellen bereits ein komplettes Netzwerk durch das Hydrogel. Bei dem GelMA-V2-Hydrogel konnten erst an Tag 7 einige ausgerichtete Zellen detektiert werden. Das GelNB/GelS-Hydrogel ermöglichte somit eine schnellere Adhäsion und Ausrichtung der Zellen innerhalb des Hydrogels als das GelMA-V2-Hydrogel.

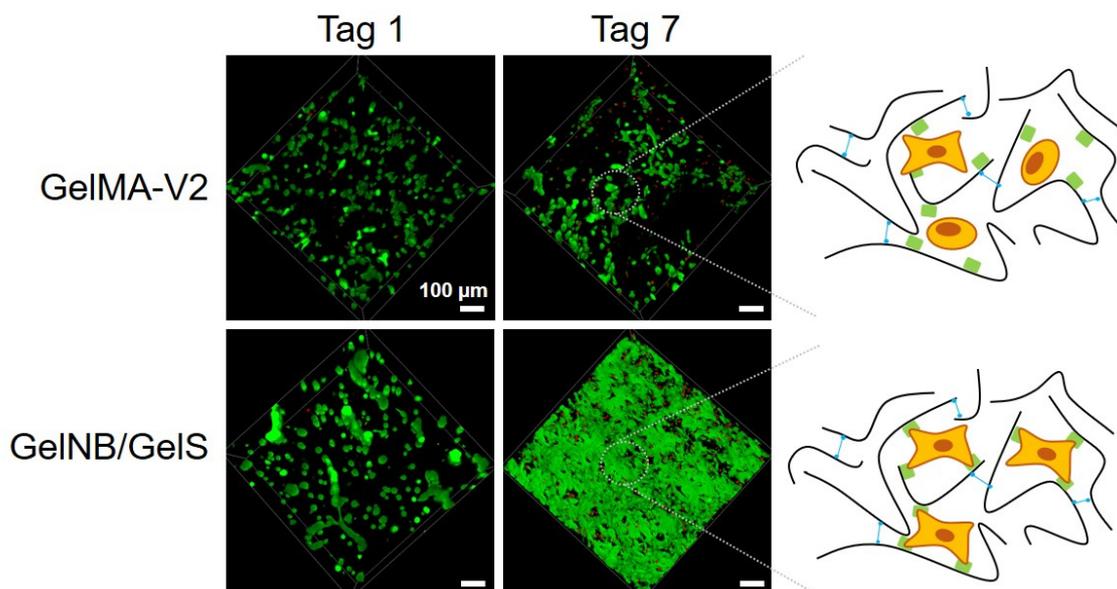


Abbildung 85: Vergleich der Lebend/Tot-Färbung der NHDF in den beiden Hydrogelen GelMA-V2 *low* und GelNB/GelS *low*. Eine Elongation und Ausrichtung der Zellen war bei dem GelNB/GelS-Gel bereits an Tag 1 zu detektieren. Nach 7 Kultivierungstagen bildeten die Zellen bereits ein dichtes Netzwerk innerhalb der Hydrogelstruktur aus. Bei dem GelMA-V2-Hydrogel konnten erste ausgerichtete Zellen erst an Tag 7 detektiert werden.

Anhand dieser Ergebnisse konnte am Beispiel der NHDF eine hohe Biokompatibilität der untersuchten Hydrogele nachgewiesen werden, wobei die Adhäsion und Ausrichtung der NHDF besonders schnell bei den GelNB/GelS-Hydrogelen stattfand.

4.5.1.3 3D-Einbettung primärer Endothelzellen

Um die Biokompatibilität der Hydrogele an möglichst vielen verschiedenen eingekapselten Zelltypen zu evaluieren, wurden auch primäre humane Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) in die vier verschiedenen Hydrogele eingebettet. Auch hier handelte es sich, im Gegensatz zu Krebszelllinien, um nicht immortalisierte Zellen. Die Endothelzellen kleiden die Innenseite von Blutgefäßen aus und sind damit nicht einem speziellen Organ- bzw. Gewebetyp zuzuordnen.²⁶²

GelMA-V1

Zunächst wurde die Biokompatibilität des GelMA-V1-Hydrogels in den Varianten *low*, *medium* und *high* an den HUVEC untersucht. Die Ergebnisse der Lebend/Tot-Färbung zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 sind in Abbildung 86 dargestellt. Mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica TCE SPE) wurden Z-Stack Aufnahmen der Gele mit einer Höhe von 300 µm aufgezeichnet und anschließend mit der Software Leica LasX in 3D-Bilder rekonstruiert.

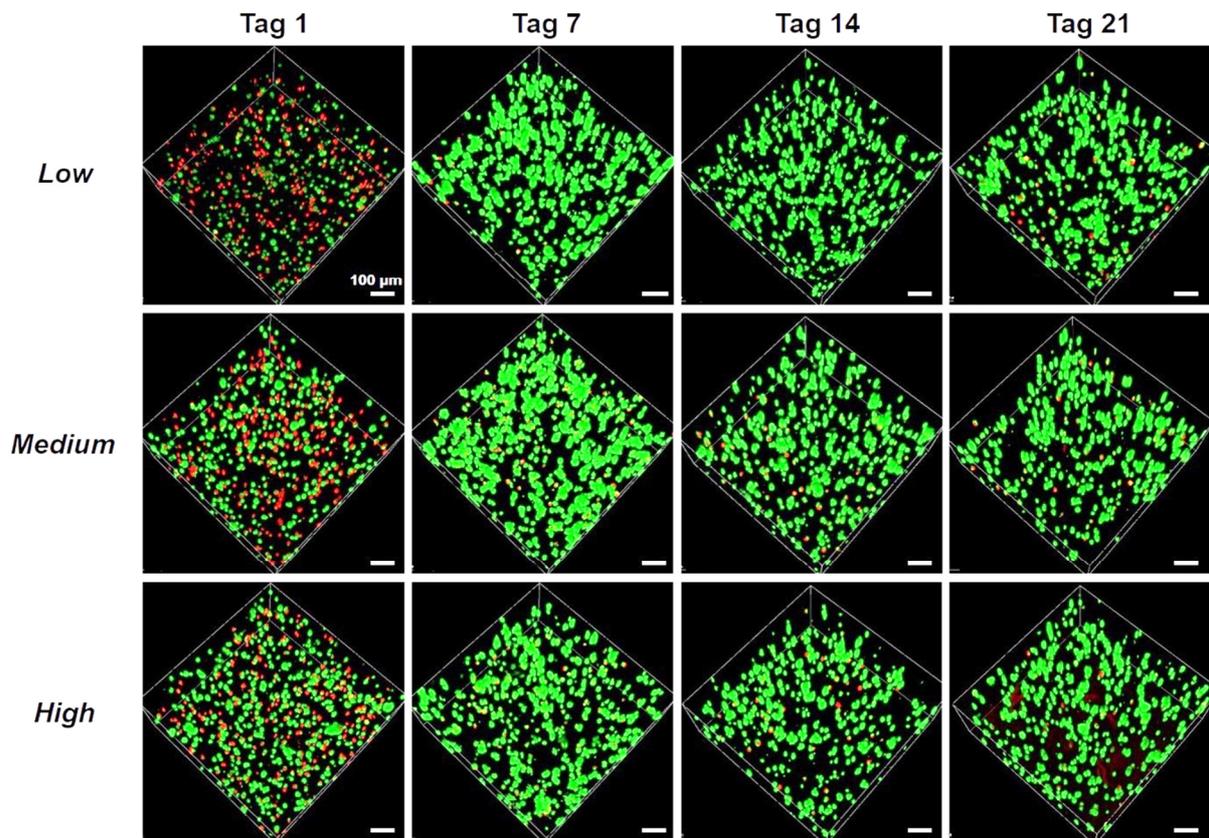


Abbildung 86: Kultivierung und Lebend/Tot-Färbung der im Hydrogel GelMA-V1 low, medium und high eingebetteten HUVEC (5 % GelMA-V1 mit 0,3 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml). Die Lebend/Tot-Färbung mit $4 \mu\text{M}$ Calcein-AM (grün, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$) und $0,02 \text{ mg/ml}$ Propidiumiodid (rot, $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}650 \text{ nm}$) wurde zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: $300 \mu\text{m}$, Schrittgröße $5 \mu\text{m}$). Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Leica LasX-Software. Maßstab: $100 \mu\text{m}$.

Bereits an Tag 1 der Kultivierung wurde ein hoher Anteil roter und somit nekrotischer Zellen in allen drei Hydrogelvarianten detektiert. Dies änderte sich jedoch im Verlauf der Kultivierungsdauer. Der Anteil nekrotischer Zellen ging deutlich zurück und es waren vermehrt grüne und damit lebende Zellen auf den 3D Bildern zu erkennen. Ein Unterschied in der Zellmorphologie der HUVEC war über den gesamten Zeitraum nicht zu beobachten. Die Zellen wiesen sowohl an Tag 1, als auch an Tag 21 eine runde Morphologie auf. Eine Ausrichtung innerhalb der GelMA-V1-Hydrogele konnte nicht detektiert werden. Zur quantitativen Bestimmung der Zellviabilität wurde der Anteil lebender und toter Zellen mit Hilfe einer Software zur Bildauswertung bestimmt und daraus die Viabilität der HUVEC für alle drei Gelvarianten zu den unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt. Diese sind in Abbildung 87 dargestellt.

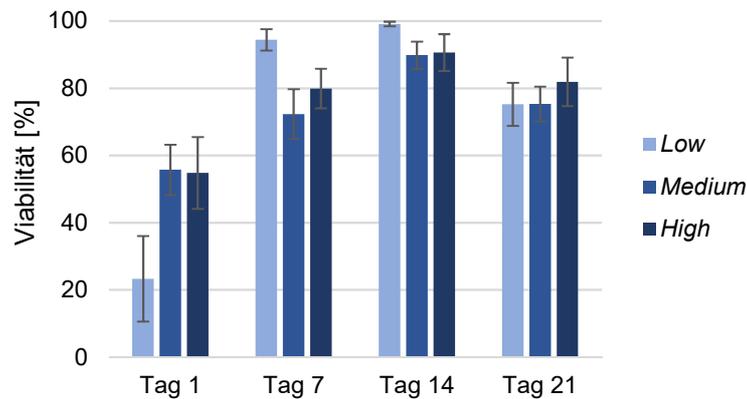


Abbildung 87: Viabilitäten der eingekapselten HUVEC in den GelMA-V1-Hydrogelen *low*, *medium* und *high* über einen Kultivierungszeitraum von 21 Tagen.

Wie bereits mit Hilfe der 3D Bilder gezeigt wurde, lag die Viabilität der HUVEC an Tag 1 lediglich bei 23 % für GelMA-V1 *low*, und bei jeweils 54 % für GelMA-V1 *medium* und *high*. Grund für diese geringen Viabilitäten könnte der lichtinduzierte Vernetzungsprozess des Hydrogels darstellen. Aber auch der Photoinitiator LAP könnte toxisch auf die HUVEC gewirkt haben. Im weiteren Verlauf der Kultivierung nahmen die Viabilitäten der Endothelzellen wieder zu und lagen an Tag 14 bei 99 % für *low*, und 88 % für *medium* und *high*. An Tag 21 sanken die Viabilitäten dann wieder leicht auf unter 80 % ab. Um die gleichmäßige Verteilung der Zellen innerhalb der drei Hydrogelvarianten zu überprüfen, wurden mit der Software Leica LasX Tiefenfärbungen der 3D Bilder durchgeführt. Diese sind in Abbildung 88 dargestellt. Eine gleichmäßige Verteilung der HUVEC in allen Gelschichten konnte für alle drei GelMA-V1-Varianten über den kompletten Kultivierungszeitraum detektiert werden.

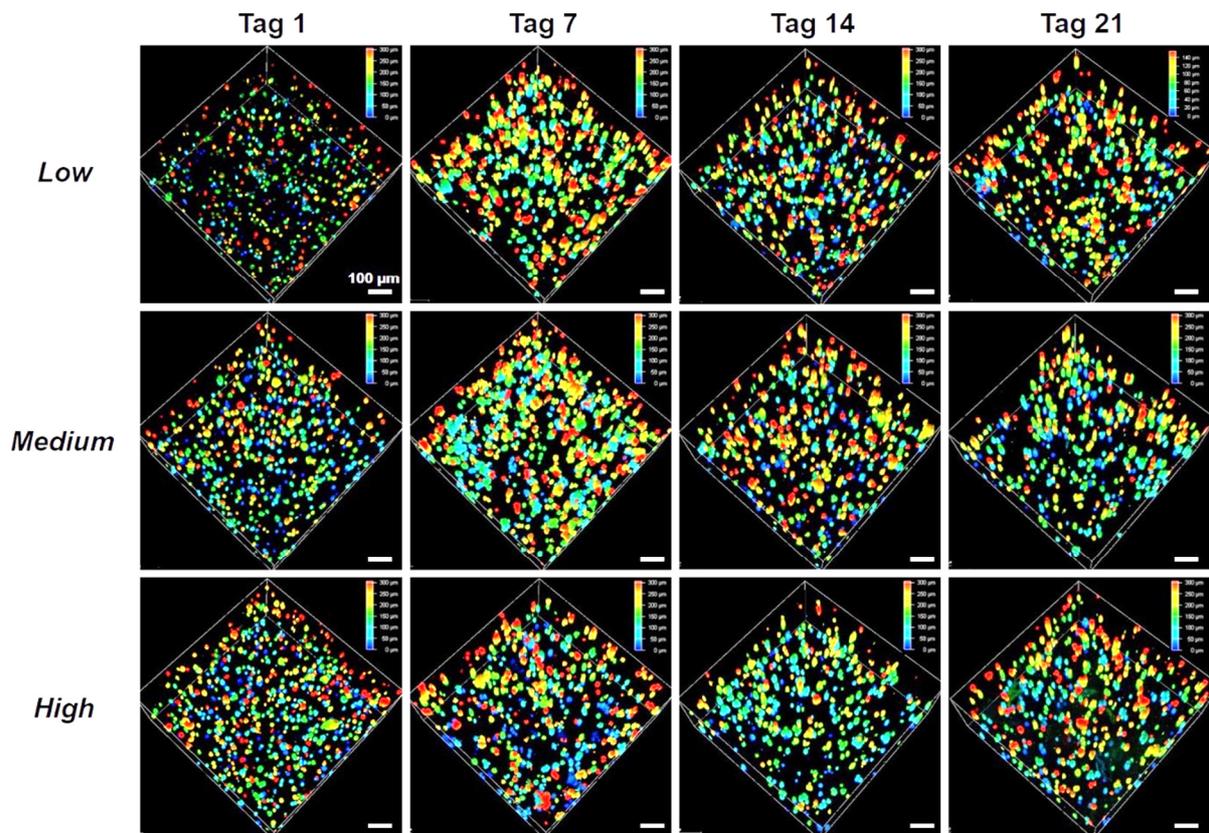


Abbildung 88: Tiefenfarbung der im Hydrogel GelMA-V1 low, medium und high eingebetteten HUVEC (5 % GelMA-V1 mit 0,3 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: 300 μm , Schrittgröße 5 μm). Die 3D-Rekonstruktion und Tiefenfarbung erfolgte mit der Leica LasX-Software. Skalierung der Tiefenfarbung: 50 μm , blau: 0 μm , rot: 300 μm . Maßstab: 100 μm .

GelMA-V2

In einem nächsten Schritt wurde die Biokompatibilität der GelMA-V2-Hydrogele *low*, *medium* und *high* anhand der eingekapselten HUVEC über einen Zeitraum von 21 Tagen näher charakterisiert. Die Ergebnisse der Lebend/Tot-Färbung zu den verschiedenen Zeitpunkten sind in Abbildung 90 dargestellt. Mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica TCE SPE) wurden Z-Stack Aufnahmen der Gele mit einer Höhe von 300 μm aufgezeichnet und anschließend mit der Software Leica LasX in 3D-Bilder rekonstruiert.

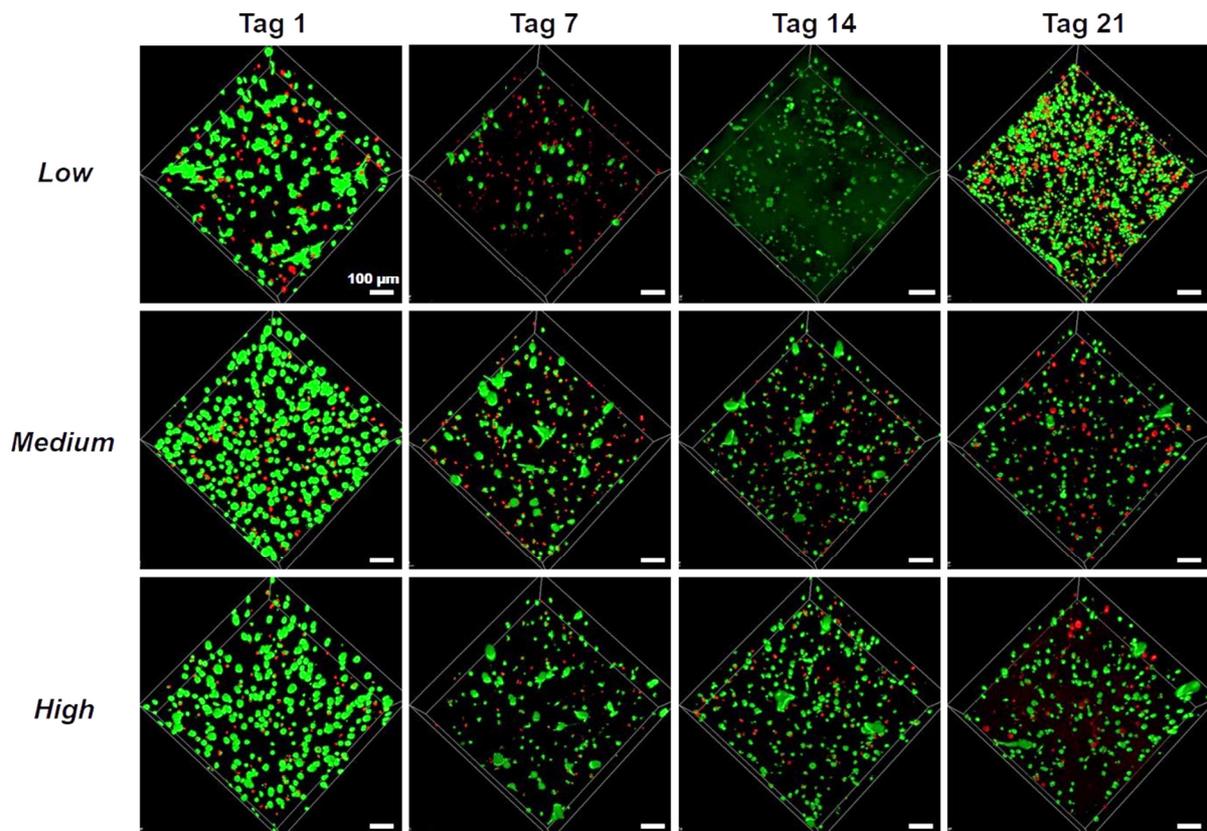


Abbildung 89: Kultivierung und Lebend/Tot-Färbung der im Hydrogel GelMA-V2 low, medium und high eingebetteten HUVEC (5 % GelMA-V2 mit 0,3 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml). Die Lebend/Tot-Färbung mit $4 \mu\text{M}$ Calcein-AM (grün, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$) und $0,02 \text{ mg/ml}$ Propidiumiodid (rot, $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}650 \text{ nm}$) wurde zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: $300 \mu\text{m}$, Schrittgröße $5 \mu\text{m}$). Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Leica LasX-Software. Maßstab: $100 \mu\text{m}$.

An Tag 1 konnten für alle drei Hydrogelvarianten ein hoher Anteil lebender HUVEC detektiert werden. Im weiteren Verlauf der Kultivierung nahm der Anteil lebender Zellen jedoch deutlich ab und es waren vermehrt rote und damit tote Zellen zu beobachten. Es konnte jedoch für alle drei GelMA-V2 Gele eine Veränderung in der Morphologie der HUVEC detektiert werden. Im low-Gel wiesen vereinzelte Zellen bereits an Tag 1 eine leicht ausgerichtete und elongierte Form auf. Dies war jedoch im weiteren Kultivierungsverlauf nicht mehr zu beobachten. In den medium- und high-Gelen konnten erste elongierte HUVEC Zellen an Tag 7 detektiert werden. Auch an Tag 14 lagen vereinzelt ausgerichtete Zellen im Hydrogel vor. Nach 21 Tagen sank aber auch in den medium- und high-Gelen der Anteil ausgerichteter Zellen deutlich ab. Eine Netzwerkbildung konnte nicht detektiert werden. Um die Viabilitäten der HUVEC zu ermitteln, wurde der Anteil lebender und toter Zellen in allen Z-Stack Ebenen bestimmt und daraus die Viabilität der Endothelzellen für alle drei Gelvarianten ermittelt. Diese sind in Abbildung 90 dargestellt.

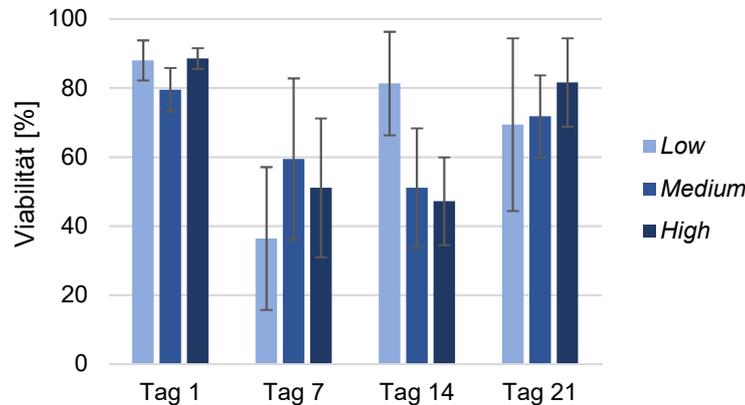


Abbildung 90: Viabilitäten der eingekapselten HUVEC in den GelMA-V2-Hydrogelen low, medium und high über einen Kultivierungszeitraum von 21 Tagen.

An Tag 1 lag die Viabilität der eingekapselten HUVEC für alle drei GelMA-V2-Varianten bei 80 % bis 90 %, nahm dann aber im weiteren Kultivierungsverlauf ab und lag an Tag 14 bei ca. 81 % für *low* und ca. 50 % für die *medium*- und *high*-Gele. An Tag 21 nahmen die Viabilitäten der HUVEC in den *medium* und *high* Gelen dann wieder auf über 70 % zu. Die geringen Viabilitäten für alle drei Gelvarianten an Tag 7 könnten darauf beruhen, dass diese Gele zuletzt unter der Aushärtungslampe Omnicure S2000 zum Gel vernetzt wurden und dadurch die re-suspendierten HUVEC länger dem toxischen Photoinitiator LAP ausgesetzt waren. Das leichte Absinken der Viabilität in den *low*-Gelen von Tag 14 bis Tag 21 könnte durch die zunehmende Instabilität des Gels erklärt werden. So begann dieses sich aufzulösen und die Gelhöhe nahm deutlich ab. Die eingekapselten Zellen wurden dadurch aus dem Gel herausgelöst, was sich negativ auf die Viabilität auswirkte. Um die gleichmäßige Verteilung der HUVEC innerhalb der Gelebenen zu überprüfen, wurde eine Tiefenfärbung der 3D-Bilder durchgeführt. Diese sind in Abbildung 91 dargestellt. So war für alle Gele eine gleichmäßige Verteilung der eingekapselten HUVEC Zellen über den gesamten Kultivierungszeitraum zu detektieren. Die einzige Ausnahme stellte das *low*-Gel an Tag 21 dar. Hier betrug die Gelhöhe lediglich 140 μm und die HUVEC Zellen befanden sich alle in einer Ebene des Gels und waren daher in der Tiefenfärbung blau gefärbt.

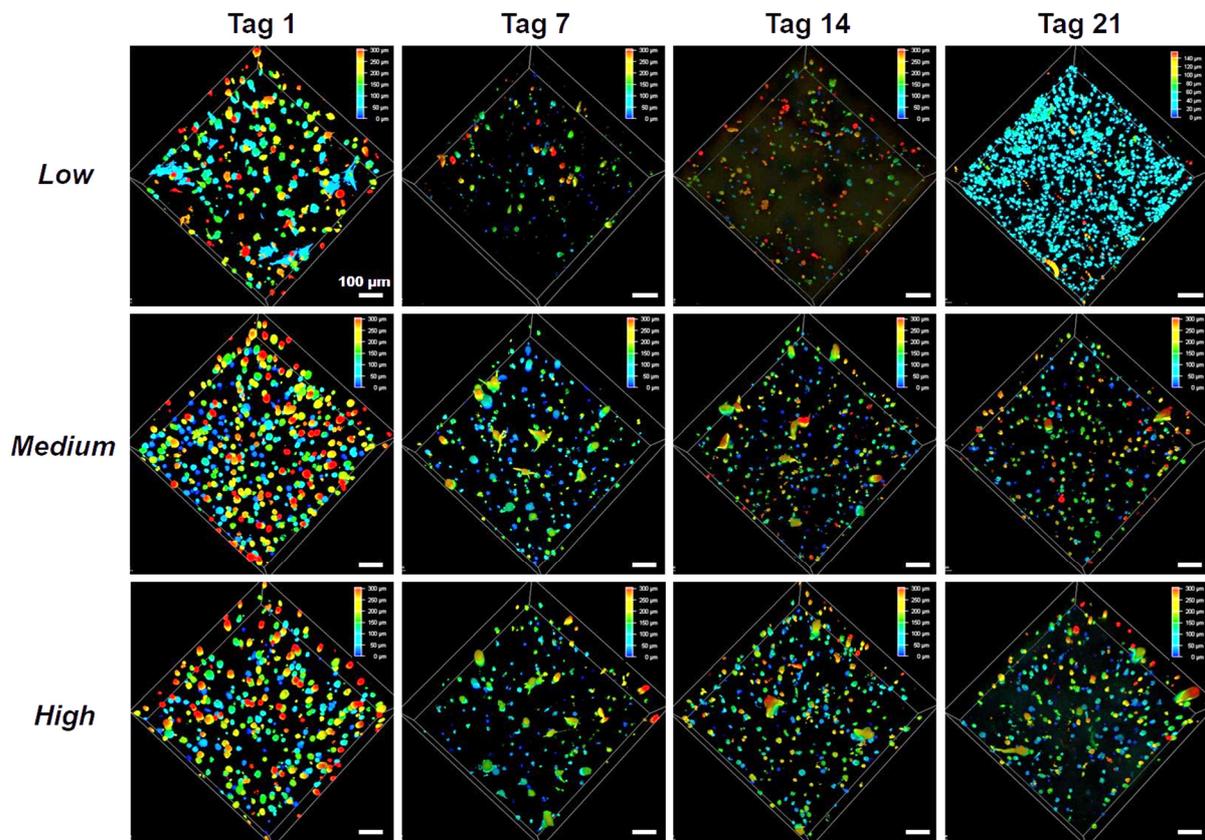


Abbildung 91: Tiefenfarbung der im Hydrogel GeIMA-V2 low, medium und high eingebetteten HUVEC (5 % GelMA-V2 mit 0,3 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: 300 μm , Schrittgröße 5 μm). Die 3D-Rekonstruktion und Tiefenfarbung erfolgte mit der Leica LasX-Software. Skalierung der Tiefenfarbung: 50 μm , blau: 0 μm , rot: 300 μm . Maßstab: 100 μm .

GeINB/DTT

Auch die Biokompatibilität der drei GeINB/DTT-Hydrogele *low*, *medium* und *high* wurde anhand der eingebetteten HUVEC Zellen über einen Zeitraum von 21 Tagen untersucht. Die Ergebnisse der Lebend/Tot-Färbung sind in Abbildung 92 dargestellt. Mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica TCE SPE) wurden Z-Stack Aufnahmen der Gele mit einer Höhe von 300 μm aufgezeichnet und anschließend mit der Software Leica LasX in 3D-Bilder rekonstruiert.

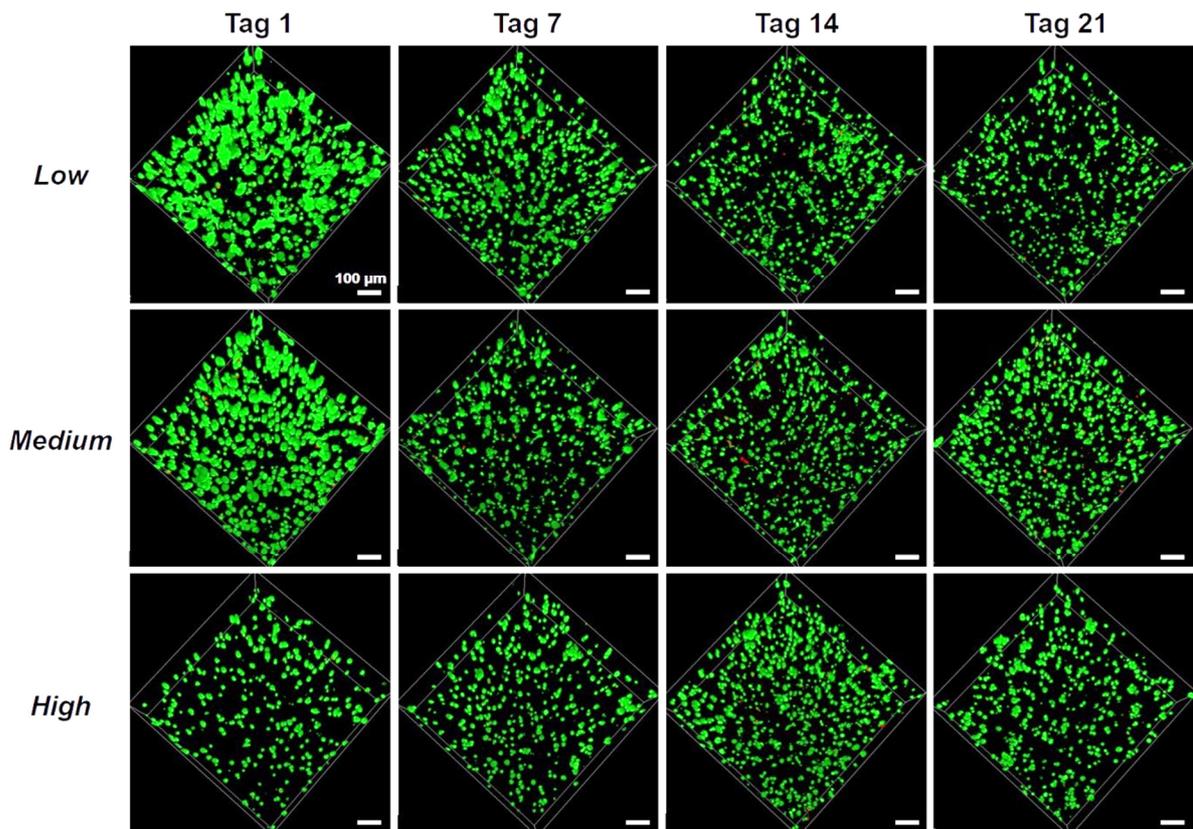


Abbildung 92: Kultivierung und Lebend/Tot-Färbung der im Hydrogel GeINB/DTT low, medium und high eingebetteten HUVEC (5 % GeINB mit 5,4 mM, 8mM oder 15 mM DTT, 0,03 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml). Die Lebend/Tot-Färbung mit 4 μ M Calcein-AM (grün, $\lambda_{ex} = 488$ nm, $\lambda_{em} = 500-550$ nm) und 0,02 mg/ml Propidiumiodid (rot, $\lambda_{ex} = 532$ nm, $\lambda_{em} = 550-650$ nm) wurde zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: 300 μ m, Schrittgröße 5 μ m). Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Leica LasX-Software. Maßstab: 100 μ m.

Wie in Abbildung 92 zu erkennen ist, konnten über den gesamten Kultivierungszeitraum für alle drei GeINB/DTT-Varianten ein hoher Anteil grüner und damit lebender Zellen detektiert werden. Eine Zunahme nekrotischer Zellen konnte qualitativ nicht beobachtet werden. Die Morphologie der HUVEC veränderte sich jedoch nur in den *low*-Gelen. So konnten bereits an Tag 1 erste elongierte und ausgerichtete HUVEC detektiert werden. Der Anteil dieser Zellen nahm jedoch im weiteren Kultivierungsverlauf deutlich ab. An Tag 21 konnte keine Ausrichtung der Zellen innerhalb des Hydrogels festgestellt werden. In den *medium*- und *high*-Varianten der Gele wiesen die Endothelzellen über den gesamten Kultivierungszeitraum eine runde Zellmorphologie auf. Um die Viabilitäten der HUVEC zu den verschiedenen Zeitpunkten in den drei verschiedenen Hydrogelvarianten zu bestimmen, wurde der Anteil lebender und toter Zellen in allen Gelebenen und daraus die Viabilitäten ermittelt. Diese sind in Abbildung 93 dargestellt.

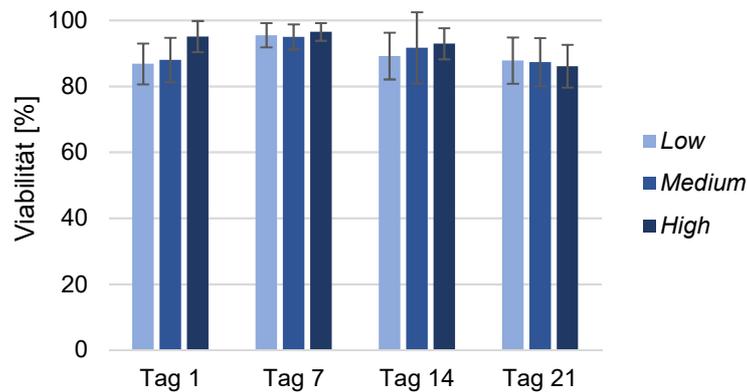


Abbildung 93: Viabilitäten der eingekapselten HUVEC in den GelNB/DTT-Hydrogelen low, medium und high über einen Kultivierungszeitraum von 21 Tagen.

Die Viabilität der HUVEC lag für den untersuchten Kultivierungszeitraum von 21 Tagen für alle drei Gelvarianten bei über 80 % und änderte sich nicht signifikant. Der Unterschied im Vergleich zu den Zellviabilitäten der in den GelMA-Hydrogelen eingekapselten HUVEC könnte auf dem Vernetzungsprozess der GelNB/DTT-Gele beruhen. Da dieser über eine radikalische Stufenpolymerisation erfolgt und zu den Click-Reaktionen zählt, wird weniger Photoinitiator für eine erfolgreiche Vernetzung benötigt. Zusätzlich werden weniger freie Radikale während der Reaktion freigesetzt, welche einen negativen Einfluss auf die Zellviabilität ausüben können. Um die gleichmäßige Verteilung der Zellen innerhalb der Gelebenen zu detektieren, wurde mit der Leica LasX Software eine Tiefenfärbung der 3D-Bilder durchgeführt. Diese sind in Abbildung 94 dargestellt. Für alle drei Gelvarianten konnte eine gleichmäßige Verteilung der HUVEC in allen Gelebenen festgestellt werden. Auch die Stabilität der Gele änderte sich über den Kultivierungszeitraum nicht, ein Abbau der Hydrogele konnte nicht festgestellt werden.

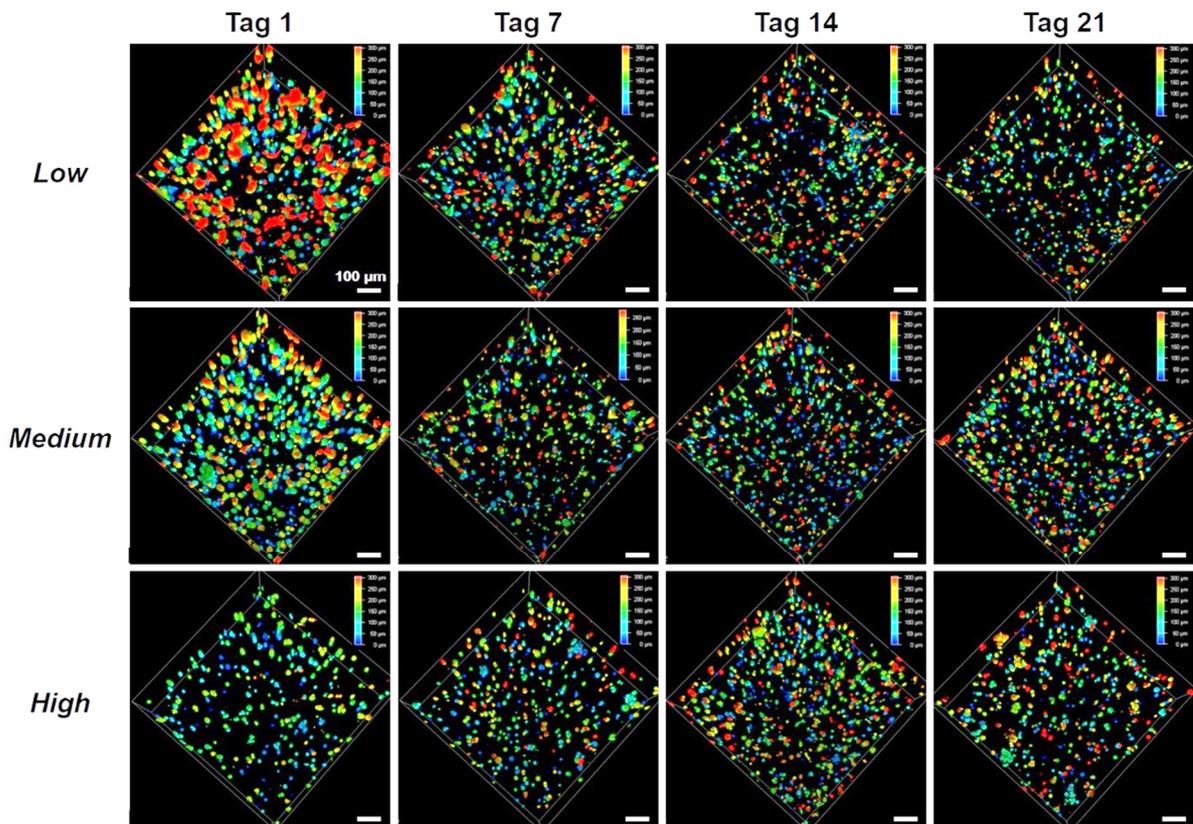


Abbildung 94: Tiefenfärbung der im Hydrogel GeINB/DTT low, medium und high eingebetteten HUVEC (5 % GeINB mit 5,4 mM, 8mM oder 15 mM DTT, 0,03 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: 300 µm, Schrittgröße 5 µm). Die 3D-Rekonstruktion und Tiefenfärbung erfolgte mit der Leica LasX-Software. Skalierung der Tiefenfärbung: 50 µm, blau: 0 µm, rot: 300 µm. Maßstab: 100 µm.

GeINB/GeIS

In einem nächsten Schritt wurde die Biokompatibilität der drei neuartigen GeINB/GeIS-Hydrogele *low*, *medium* und *high* anhand der eingebetteten HUVEC Zellen über einen Zeitraum von 21 Tagen untersucht. Die Ergebnisse der Lebend/Tot-Färbung sind in Abbildung 95 dargestellt. Mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica TCE SPE) wurden Z-Stack Aufnahmen der Gele mit einer Höhe von 300 µm aufgezeichnet und anschließend mit der Software Leica LasX in 3D-Bilder rekonstruiert.

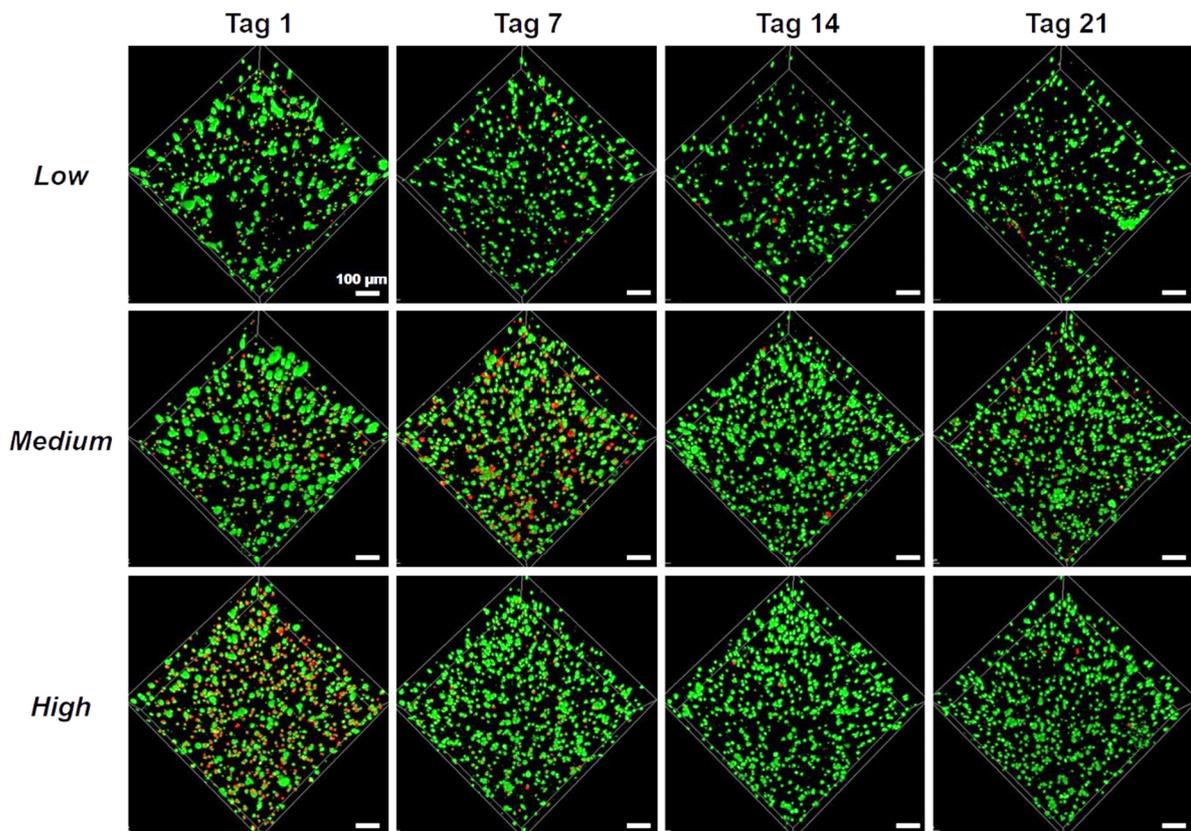


Abbildung 95: Kultivierung und Lebend/Tot-Färbung der im Hydrogel GeINB/GelS low, medium und high eingebetteten HUVEC (5 % GeINB und GelS mit 0,03 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml). Die Lebend/Tot-Färbung mit $4 \mu\text{M}$ Calcein-AM (grün, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$) und $0,02 \text{ mg/ml}$ Propidiumiodid (rot, $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}650 \text{ nm}$) wurde zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: $300 \mu\text{m}$, Schrittgröße $5 \mu\text{m}$). Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Leica LasX-Software. Maßstab: $100 \mu\text{m}$.

An Tag 1 waren für das low und medium Gel viele grüne und damit lebende Zellen zu detektieren. In der high-Variante wurden dagegen auch viele rote und damit nekrotische Zellen detektiert. An Tag 7 konnte auch bei dem medium-Gel ein erhöhter Anteil nekrotischer Zellen festgestellt werden. An Tag 14 und Tag 21 konnten in allen drei Varianten jedoch wieder sehr viele grüne und damit lebende Zellen detektiert werden. Die Morphologie der eingebetteten HUVEC änderte sich über den gesamten Kultivierungszeitraum nicht. Die Zellen wiesen sowohl an Tag 1 als auch Tag 21 eine runde Struktur auf. Eine Elongation und Ausrichtung innerhalb der verschiedenen Hydrogele konnte nicht detektiert werden. Lediglich im GeINB/GelS low-Gel konnten an Tag 1 vereinzelte ausgerichtete Zellen festgestellt werden. Die quantitative Bestimmung der Viabilität erfolgte mit Hilfe einer Software zur Bildauswertung. Die Ergebnisse sind in Abbildung 96 dargestellt.

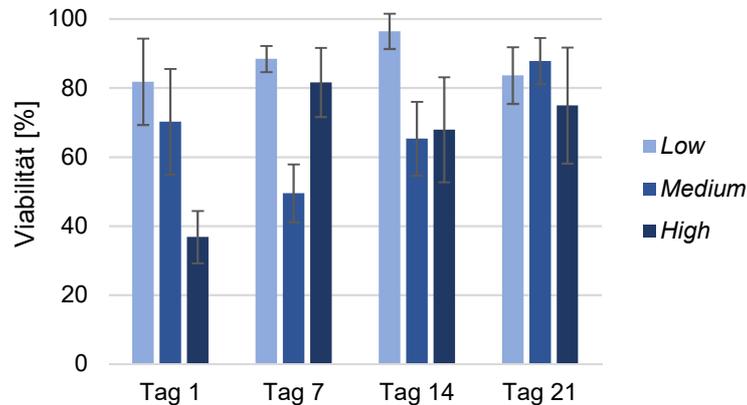


Abbildung 96: Viabilitäten der eingekapselten HUVEC in den GelNB/GelS-Hydrogelen low, medium und high über einen Kultivierungszeitraum von 21 Tagen.

Die ermittelten Viabilitäten der eingekapselten HUVEC lagen für die *low*-Variante über den gesamten Kultivierungszeitraum über 80 % und wiesen damit die höchsten Werte der drei Gelvarianten auf. Für die GelNB/GelS *medium*-Gele konnte an Tag 1 eine Viabilität von 70 % detektiert werden. Diese sank jedoch an Tag 7 auf ca. 50 % ab und nahm dann bis Tag 21 wieder auf über 80 % zu. Ein möglicher Grund für die geringe Viabilität der HUVEC an Tag 7 könnte eine mangelnde Nährstoffversorgung sein. Zusätzlich könnte das Gel bei den durchgeführten Mediumwechseln beschädigt worden sein, wodurch die Zellviabilität auch absinken könnte. Auch bei der *high*-Variante wurde an Tag 1 lediglich eine Viabilität von 38 % festgestellt. Auch hier könnte das Gel bei einem Mediumwechsel beschädigt worden sein. Im weiteren Kultivierungsverlauf nahm die Viabilität der eingekapselten HUVEC jedoch wieder zu und lag zwischen 68 % und 81 %. Um die gleichmäßige Verteilung der Zellen innerhalb der Gel-ebenen zu detektieren, wurde mit der Leica LasX Software eine Tiefenfärbung der 3D-Bilder durchgeführt. Diese sind in Abbildung 97 dargestellt. Über den gesamten Kultivierungszeitraum konnte eine gleichmäßige Verteilung der HUVEC innerhalb der Hydrogele detektiert werden. Auch die Stabilität der Gele änderte sich über den Kultivierungszeitraum nicht, ein Abbau der Hydrogele konnte nicht festgestellt werden.

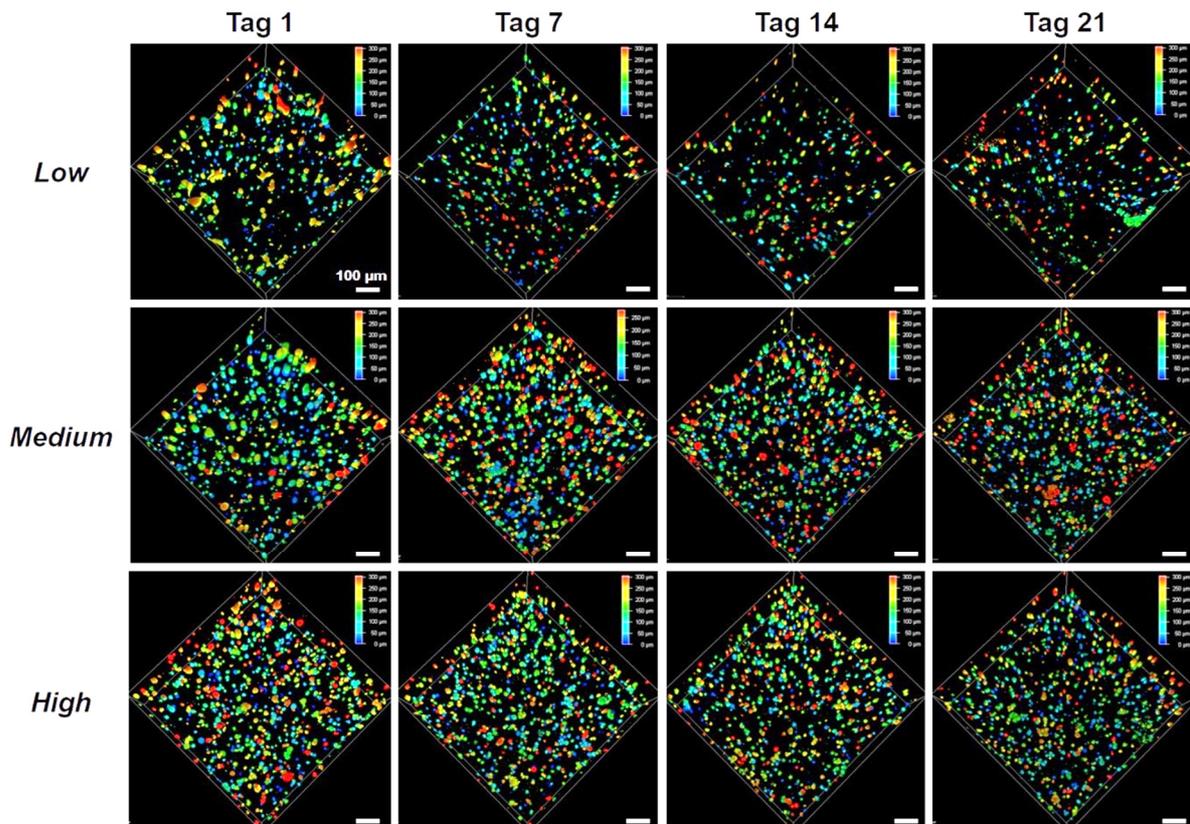


Abbildung 97: Tiefenfärbung der im Hydrogel GeINB/GeIS low, medium und high eingebetteten HUVEC (5 % GeINB und GeIS mit 0,03 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: 300 μm , Schrittgröße 5 μm). Die 3D-Rekonstruktion und Tiefenfärbung erfolgte mit der Leica LasX-Software. Skalierung der Tiefenfärbung: 50 μm , blau: 0 μm , rot: 300 μm . Maßstab: 100 μm .

Insgesamt konnten von den vier verschiedenen untersuchten Hydrogelen die höchsten Viabilitäten der HUVEC in den GeINB/DTT-Gelen detektiert werden. Ein Grund dafür könnte der Vernetzungsprozess des Hydrogels darstellen. Durch die Thiol-En Reaktion werden während der Vernetzung im Vergleich zur radikalischen Kettenreaktion der GeIMA-Gele weniger Radikale frei, welche durch Reaktion mit Zellkomponenten einen toxischen Effekt auf die eingekapselten Zellen ausüben können. Zusätzlich musste bei dieser Vernetzungsreaktion weniger Photoinitiator zugesetzt werden. Auch dieser wirkt sich, besonders in höheren Konzentrationen, negativ auf die Viabilität der eingekapselten Zellen aus (siehe Kapitel 4.2.2). Die geringen Viabilitäten an Tag 1 in den drei GeIMA-V1-Varianten *low*, *medium* und *high* und in dem GeINB/GeIS *high*-Gel könnte ebenfalls auf den Vernetzungsprozess zurückzuführen sein. So könnten diese Gele zuletzt unter der Aushärtungslampe Omnicure S2000 vernetzt worden sein, wodurch die Viabilität der Zellen durch den Photoinitiator oder Nährstoffmangel aufgrund von fehlendem Kulturmedium abnahm. Für alle vier untersuchten Hydrogele erwiesen sich die *low*-Varianten am kompatibelsten, da die HUVEC in diesen Gelen Viabilitäten von ca. 80 %

über den gesamten Kultivierungszeitraum aufwiesen. In diesen Gelen konnten zudem auch bereits an Tag 1 beginnende Zellausrichtungen der HUVEC detektiert werden. Ein Grund dafür könnte die geringe Festigkeit der *low*-Hydrogelvarianten darstellen. Aufgrund des geringeren Vernetzungsgrades wiesen diese Gelvarianten größere Poren und eine erhöhte Flexibilität auf. Somit hätten die eingekapselten HUVEC ausreichend Platz für eine Elongation und Migration. Zusätzlich wäre eine Remodellierung der Umgebungsmatrix für die Zellen in den *low*-Hydrogelen einfacher, da diese durch die größeren Poren flexibler sind und weniger Bindungen enzymatisch gespalten werden müssten. Die beginnende Ausrichtung der HUVEC konnte jedoch nur zu Beginn der Kultivierung detektiert werden. Nach 14 Tagen waren keine elongierten Zellen mehr zu detektieren und auch eine Netzwerkbildung der HUVEC innerhalb der Hydrogele konnte nicht detektiert werden. Im Hydrogel GelMA konnte von Monteiro *et al.* jedoch eine vaskuläre Netzwerkbildung von eingekapselten HUVEC detektiert werden.²⁶³ Diese lagen jedoch nicht einzeln, sondern mit einem weiteren Zelltyp gemischt als Cokultur vor. Zusätzlich konnte von Monteiro *et al.* festgestellt werden, dass eine stabile Netzwerkbildung nur bei hohen Zellkonzentrationen von 10×10^6 Zellen/ml stattfand.²⁶³ Die Tiefenfärbung der 3D-Bilder zeigte für alle Hydrogele eine gleichmäßige Verteilung der Endothelzellen innerhalb der Hydrogele. Somit konnte in diesem Versuch eine Eignung der *low*-Varianten der verschiedenen Hydrogele für eine 3D-Kultivierung der HUVEC festgestellt werden.

Für alle drei untersuchten Zelltypen konnte eine Eignung der verschiedenen Hydrogele GelMA-V1, GelMA-V2, GelNB/DTT und GelNB/GelS für eine 3D-Kultivierung festgestellt werden. Signifikante Unterschiede konnten nicht detektiert werden. Für diese Versuche fand der Vernetzungsprozess jedoch direkt nach dem Resuspendieren der Zellen in den Photopolymerlösungen statt, wodurch toxische Effekte der Komponenten in den Lösungen verringert wurden. Beim Einsatz der verschiedenen Materialien für 3D-Biodruckversuche können zwischen dem Ansetzen der Biotinte und dem Vernetzungsprozess Minuten bis Stunden liegen. In diesem Fall könnten sich Reaktionen der Methacrylamidgruppen, der Crosslinker oder der Photoinitiatoren stark auf die Viabilität der enthaltenen Zellen auswirken.

4.5.2 Proliferationsverhalten eingekapselter Zellen

Neben der Beurteilung der Biokompatibilität der Hydrogele anhand der Viabilität von darin eingekapselten Zellen, wurde diese auch anhand der Proliferation eingekapselter Leberkrebszellen und primären Fibroblasten über einen Zeitraum von 21 Tagen untersucht. Bei einer 3D-Kultivierung von Zellen in den Stützmaterialien sind nicht nur die Viabilität und die Zellausrichtung innerhalb der Hydrogele von großer Bedeutung für den erfolgreichen Aufbau von Gewebemodellen, sondern auch die Proliferation der eingekapselten Zellen in den Strukturen. Um das Proliferationsverhalten der eingebetteten Zellen zu charakterisieren wurde der PrestoBlue-Assay durchgeführt. Dazu wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml in den jeweiligen Polymerlösungen resuspendiert und je 100 μ l der Suspension in die Wells einer 96-Well-Platte überführt und unter der Aushärtungslampe Omnicure S2000 zum Hydrogel vernetzt. Die Kultivie-

Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂. An Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 wurde das Kulturmedium abgenommen und die Gele mit dem blauen PrestoBlue-Reagenz versetzt. Lebende und metabolisch aktive Zellen können das Resazurin-basierte Reagenz zum roten und stark fluoreszierenden Farbstoff Resorufin reduzieren. Dieser Vorgang ist in Abbildung 98 dargestellt. Somit kann das Proliferationsverhalten der Zellen anhand der Fluoreszenzintensität zu den verschiedenen Zeitpunkten verfolgt werden. Im Anschluss an die zweistündige Inkubationszeit erfolgte die Fluoreszenzmessung mit einem Mikroplattenleser. Als Blank diente das jeweilige Hydrogel ohne eingebettete Zellen.

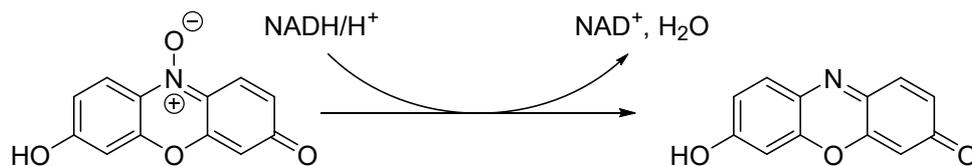


Abbildung 98: Reduktion des blauen Resazurin zum roten Resorufin in metabolisch aktiven Zellen durch NADH.

Da der Assay auf der Reduktion des blauen PrestoBlue-Reagenzes durch die Zellen beruht, konnte das Proliferationsverhalten der Zellen in den GelNB/DTT-Hydrogelen nicht untersucht werden, da der Crosslinker DTT das Färbereagenz ebenfalls reduzierte und so für eine Verfälschung der Fluoreszenzintensität sorgte.

4.5.2.1 Proliferation von Krebszellen

Zunächst wurde das Proliferationsverhalten der Leberkrebszelllinie HepG2 in den drei Hydrogelen GelMA-V1, GelMA-V2 und GelNB/GelS mit Hilfe des PrestoBlue-Assays charakterisiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 99 dargestellt.

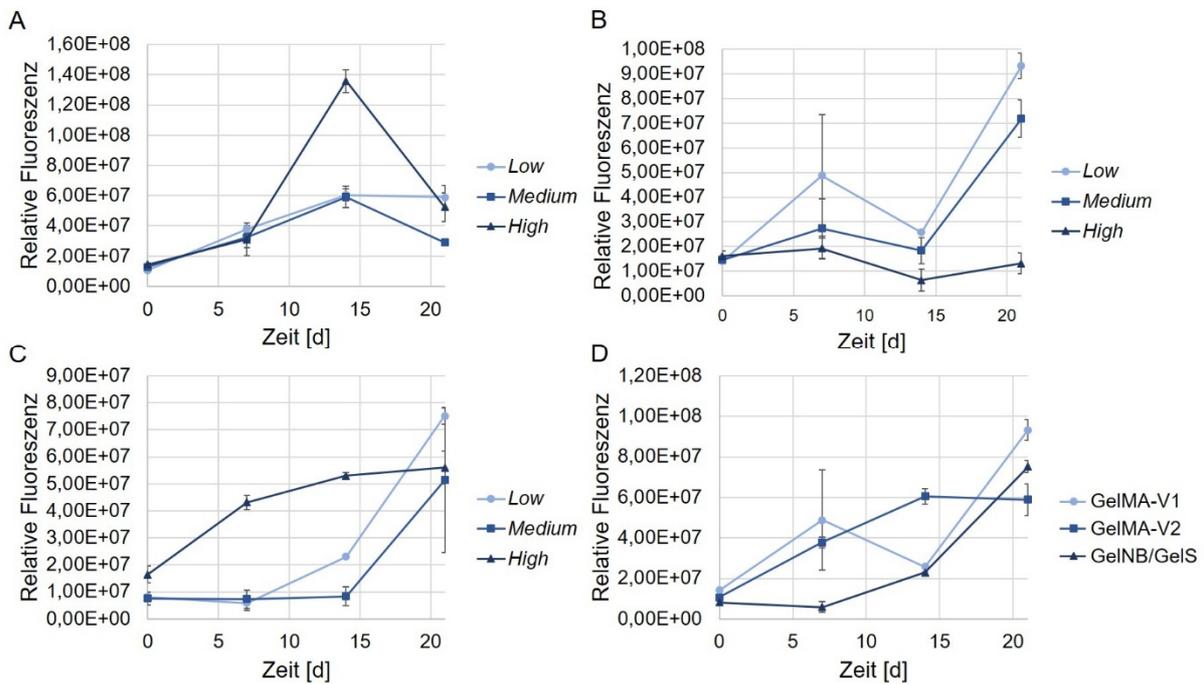


Abbildung 99: Proliferation eingekapselter HepG2 Zellen in den drei Hydrogelen GelMA-V1, GelMA-V2 und GelNB/GelS jeweils in den drei Varianten low, medium und high über einen Kultivierungszeitraum von 21 Tagen, detektiert mit Hilfe des PrestoBlue-Assays. **A:** Proliferation in GelMA-V1-Hydrogelen low, medium und high. **B:** Proliferation in GelMA-V2-Hydrogelen low, medium und high. **C:** Proliferation in GelNB/GelS-Hydrogelen low, medium und high. **D:** Vergleich der Proliferation in den drei Hydrogelen GelMA-V1 low, GelMA-V2 low und GelNB/GelS low.

In Abbildung 99 A ist das Proliferationsverhalten der HepG2 in den GelMA-V1-Hydrogelen *low*, *medium* und *high* über einen Zeitraum von 21 Tagen dargestellt. Von Tag 0 über Tag 7 bis Tag 14 konnte eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität detektiert werden. Ein besonders starker Anstieg der Fluoreszenz war für GelMA-V1 *medium* zu detektieren. Hier lag die Intensität der Fluoreszenz an Tag 14 bei ca. $1,4 \times 10^8$ und damit um 1300 % höher als der Startwert an Tag 0. Zwischen Tag 14 und Tag 21 sanken die Fluoreszenzintensität und damit die Zellzahl jedoch wieder ab, lagen aber deutlich über dem Startwert von Tag 0. Somit war eine zunehmende Proliferation der HepG2 Zellen innerhalb der GelMA-V1-Hydrogele zu verzeichnen. In Abbildung 99 B ist die Proliferation der HepG2 Zellen in den GelMA-V2-Hydrogelen *low*, *medium* und *high* dargestellt. Auch hier war von Tag 0 bis Tag 7 zunächst ein Anstieg der Fluoreszenz und damit der Zellzahl in allen drei Gelvarianten zu detektieren. Jedoch sank diese von Tag 7 bis Tag 14 deutlich ab und lag für das *high*-Gel unter dem Startwert von Tag 0. Für die *low* und *medium* Gele konnte bis Tag 21 eine Zunahme der Fluoreszenzintensität von 454 % bzw. 366 % gezeigt werden. Somit stieg auch die Anzahl der eingekapselten HepG2 Zellen in den *low*- und *medium*-Gelen über den Kultivierungszeitraum von 21 Tagen deutlich an. Das Proliferationsverhalten der in den GelNB/GelS-Hydrogelen eingekapselten HepG2 Zellen ist in Abbildung 99 C dargestellt. Für die *high*-Variante war eine kontinuierliche

Zunahme zu detektieren. Im Vergleich zum Startwert nahm die Fluoreszenzintensität bis Tag 21 um 200 % zu. Ein Anstieg der Fluoreszenz und damit der Zellzahl war für die *medium*-Variante erst ab Tag 14 zu beobachten und nahm im Vergleich zum Startwert um 450 % zu. Die größte Zunahme der Fluoreszenz war auch für das GelNB/GelS-Gel für die *low*-Variante zu detektieren. Diese nahm um 826 % zu. Somit konnte für alle untersuchten Hydrogele GelMA-V1, GelMA-V2 und GelNB/GelS besonders in den jeweiligen *low*-Gelen die größte Zunahme der Fluoreszenzintensität und damit der Anzahl an HepG2 Zellen detektiert werden. Ein möglicher Grund für dieses Verhalten könnte auf der geringen Festigkeit der *low*-Gele beruhen. Durch den geringen Funktionalisierungsgrad der jeweiligen Photopolymere weisen diese Gele den geringsten Vernetzungsgrad auf. Die dadurch enthaltenen größeren Poren bieten den eingekapselten Zellen mehr Platz für eine Migration und Proliferation. Um die Proliferation der HepG2 in den drei Hydrogelen besser miteinander zu vergleichen, wurden die Fluoreszenzintensität der jeweiligen *low*-Varianten über den Zeitraum von 21 Tagen in einem Diagramm aufgetragen. Dieses ist in Abbildung 99 D dargestellt. Die größte Zunahme im Vergleich zum Startwert wies das GelNB/GelS-Gel mit 826 % auf, gefolgt von GelMA-V1 mit 560 % und GelMA-V2 mit 454 %. Somit proliferierten die HepG2 Zellen in dem GelNB/GelS-Hydrogel stärker als in den beiden GelMA-Hydrogelen.

4.5.2.2 Proliferation primärer Fibroblasten

Das Proliferationsverhalten von primären humanen Fibroblasten, welche in den drei Hydrogelen GelMA-V1, GelMA-V2 und GelNB/GelS eingekapselt waren, wurde in einem nächsten Schritt über einen Zeitraum von 21 Tagen charakterisiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 100 dargestellt.

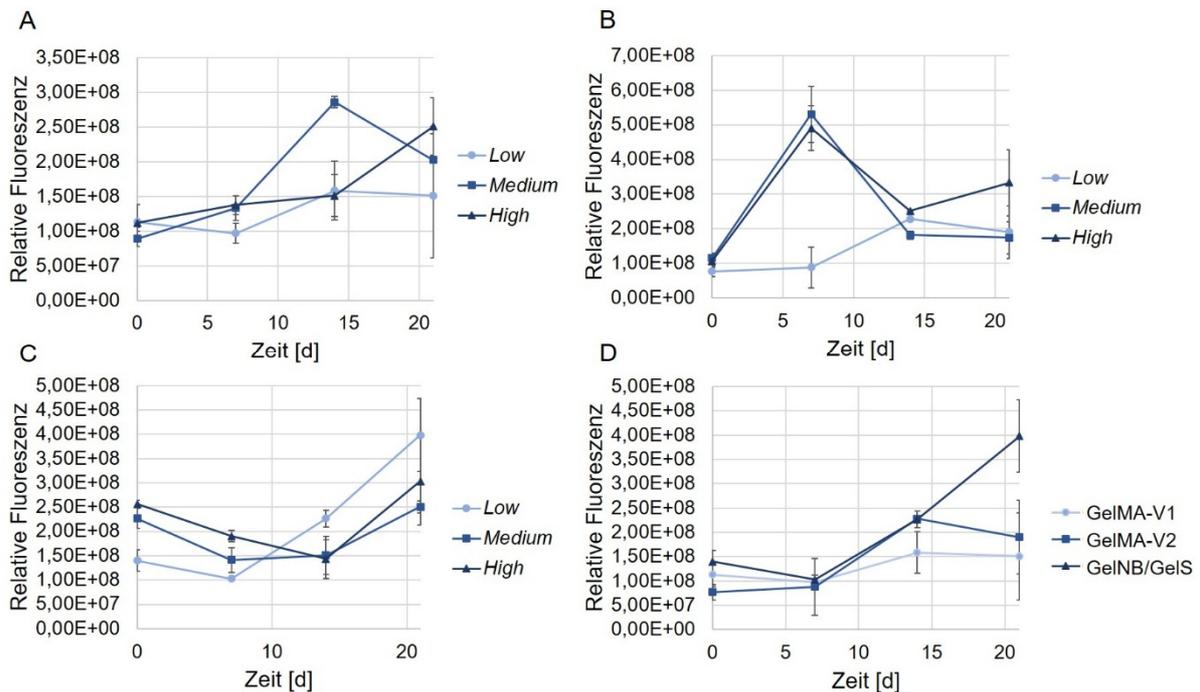


Abbildung 100: Proliferation eingekapselter NHDF in den drei Hydrogelen GelMA-V1, GelMA-V2 und GelNB/GelS jeweils in den drei Varianten low, medium und high über einen Kultivierungszeitraum von 21 Tagen, detektiert mit Hilfe des PrestoBlue-Assays. **A:** Proliferation in GelMA-V1-Hydrogelen low, medium und high. **B:** Proliferation in GelMA-V2-Hydrogelen low, medium und high. **C:** Proliferation in GelNB/GelS-Hydrogelen low, medium und high. **D:** Vergleich der Proliferation in den drei Hydrogelen GelMA-V1 low, GelMA-V2 low und GelNB/GelS low.

Das Proliferationsverhalten für die drei GelMA-V1-Hydrogele *low*, *medium* und *high* ist in Abbildung 100 A dargestellt. Für alle drei Varianten war eine Zunahme der Fluoreszenzintensität und somit der Zellzahl über den gesamten Zeitraum zu detektieren. Dabei lag die Zunahme der Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Startwert an Tag 0 für das *low*-Gel bei 35 %, für *medium* bei 128 % und für *high* bei 79 %. Somit war die Fluoreszenzzunahme durch die Proliferation der NHDF in der *medium*-Variante am größten. Dies konnte für die GelMA-V2-Hydrogele nicht detektiert werden. In Abbildung 100 B ist die Proliferation der NHDF in den drei GelMA-V2 Gelen *low*, *medium* und *high* dargestellt. Auch hier nahm die Fluoreszenzintensität von Tag 0 bis Tag 7 zu, sank dann aber für die *medium*- und *high*-Gele deutlich ab und stieg von Tag 14 bis Tag 21 nur gering an. Für das *low*-Gel konnte eine kontinuierliche Zunahme der Fluoreszenz bis Tag 14 detektiert werden. Von Tag 14 bis Tag 21 sank aber auch hier der Wert wieder leicht ab. Insgesamt wies das *high* Gel mit einer Zunahme von 211 % im Vergleich zum Startwert die größte Zunahme der Fluoreszenz und somit der Zellzahl auf. Für GelMA-V2 *low* lag der Wert bei 147 % und für *medium* lediglich bei 67 %. Die Ergebnisse der beiden Hydrogele GelMA-V1 und GelMA-V2 entsprachen nicht den Erwartungen. Wie auch bei den HepG2 Zellen wäre die größte Zunahme der Fluoreszenz und damit das stärkste Proliferationsverhal-

ten in den *low*-Varianten zu erwarten gewesen, da hier die größten Poren in der Hydrogelstruktur vorliegen und dadurch für Zellmigration und Proliferation viel Raum geboten sein sollte. Die Proliferation der eingekapselten NHDF war jedoch in den GelMA-V1 *medium*- und GelMA-V2 *high*-Varianten jeweils am stärksten. Das Proliferationsverhalten der in den GelNB/GelS-Hydrogelen eingekapselten NHDF Zellen ist in Abbildung 100 C dargestellt. Für alle drei Gelvarianten sank die Fluoreszenzintensität zunächst im Vergleich zum Startwert ab, stieg dann aber ab Tag 7 im weiteren Verlauf kontinuierlich an. Lediglich für die *high*-Variante war ein Anstieg erst ab Tag 14 zu verzeichnen. Ein möglicher Grund für das zunächst detektierte Absinken der Fluoreszenzintensität und somit der Zellzahl könnte darauf beruhen, dass sich die NHDF zunächst an ihre Umgebung adaptieren mussten und daher nicht proliferierten. Nachdem sich diese in den Hydrogelen ausgerichtet hatten, nahm auch die Proliferation der Zellen zu. Ein weiterer Grund für das Absinken könnte durch ein Beschädigen der Gele bei den Mediumwechseln entstanden sein. Dadurch könnten Zellen aus den Gelen herausgelöst worden sein. Die stärkste Zunahme der Fluoreszenzintensität und damit der Zellzahl wies mit 184 % im Vergleich zum Startwert das GelNB/GelS *low* Gel auf. Die Werte der *medium*- und *high*-Gele lagen lediglich bei 11 % bzw. 18 %. Um die Proliferation der NHDF in den drei Hydrogelen besser miteinander zu vergleichen, wurden die Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen *low*-Varianten über den Zeitraum von 21 Tagen in einem Diagramm aufgetragen. Dieses ist in Abbildung 100 D dargestellt. Mit 184 % wies das GelNB/GelS *low*-Hydrogel die stärkste Zunahme der Fluoreszenzintensität und damit der Zellzahl auf, gefolgt von GelMA-V2 *low* mit 147 % und GelMA-V1 *low* mit 35 %. Somit proliferierten die eingekapselten NHDF Zellen in der *low*-Variante der GelNB/GelS-Hydrogele stärker als in den *low*-Varianten der beiden GelMA-Hydrogele. Bei diesen erwies sich mit einer Zunahme von 211 % das GelMA-V2-Hydrogel in der hochfunktionalisierten Variante *high* als das Gel mit dem stärksten Proliferationsverhalten der NHDF.

Insgesamt nahm die Fluoreszenz und damit die Zellzahl in allen untersuchten Gelen sowohl für die Leberkrebszellen HepG2 als auch für die primären Fibroblasten NHDF über den untersuchten Zeitraum von 21 Tagen zu. Somit ermöglichten alle Gele die Proliferation der Zellen. Die deutlich größeren Zunahmen der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den Startwerten der HepG2 Zellen lässt sich auf die Natur der Zellen zurückzuführen. Da es sich bei den HepG2 um Leberkrebszellen handelt, weisen diese ein stark ausgeprägtes und unkontrolliertes Proliferationsverhalten auf.²⁶⁴ Primäre, gewebespezifische Zellen wie die NHDF proliferieren dagegen deutlich langsamer.²⁶⁵ Die größte Zunahme der Fluoreszenzintensität und damit der Zellzahl konnte für die eingebetteten HepG2 in der jeweiligen *low*-Variante der verschiedenen Hydrogele detektiert werden. Durch den geringeren Vernetzungsgrad dieser Varianten waren die Poren innerhalb der Hydrogele größer, wodurch die Zellen für eine Migration und Proliferation mehr Platz hatten. Auch eine zusätzliche Remodellierung der Gelstruktur durch enzymatischen Abbau der Zellen würde in den *low*-Gelen deutlich schneller als in den dicht vernetzten *medium*- und *high*-Varianten ablaufen. Dieser Effekt war für die eingekapselten NHDF auch bei den GelNB/GelS-Gelen zu detektieren. Auch hier wies das *low*-Gel mit 184 %

im Vergleich zum Startwert die höchste Fluoreszenzzunahme auf. Bei den beiden GelMA-Hydrogelen GelMA-V1 und GelMA-V2 war dieser Effekt nicht zu detektieren. Hier wiesen die GelMA-V1 *medium*- und GelMA-V2 *high*-Varianten die größten Zunahmen der Fluoreszenzintensität auf.

4.5.3 3D-Einbettung von Stammzellen

Besonders im Bereich der Geweberegeneration ist der Einsatz von Stammzellen zur Bildung von artifiziellem Gewebe von entscheidender Bedeutung, da sie sich in verschiedenste Zelltypen ausdifferenzieren können.²⁶⁶ In Kooperation mit Vadym Burchak (AK Prof. Finkenzeller, Universitätsklinikum Freiburg) wurde die Biokompatibilität der GelNB/GelS-Hydrogele *low*, *medium* und *high* an eingebetteten adipösen mesenchymalen Stammzellen (engl.: *adipose derived stem cells*, ASC) charakterisiert. Diese Zellen zeichnen sich auch nach ihrer Isolierung durch ein hohes Proliferationsverhalten und durch die Fähigkeit der Selbsterneuerung *in vitro* aus. Zudem kann bei diesen Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine osteogene, myogene, chondrogene oder adipogene Differenzierung stattfinden.^{267,268} Besonders im Bereich der Knochengeweberekonstruktion werden ASC häufig eingesetzt, da sie sich in Osteoplasten differenzieren können. Zusätzlich konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden, dass implantierte ASC die Heilung von Knochendefekten beschleunigen können.^{269,270} Um die Eignung der drei neuentwickelten GelNB/GelS-Hydrogele für den Einsatz im Bereich der Bildung von artifiziellem Knochengewebe zu untersuchen, wurden die ASC in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml in den Hydrogelen eingekapselt. Das verwendete Hydrogel GelNB/GelS *low* unterschied sich in diesem Versuch jedoch in der Zusammensetzung vom in Kapitel 6.2.5.4 beschriebenen. Als Photopolymer 1 diente GelNB *medium* (2 Äq), als Photopolymer 2 diente GelS *low* (1 Äq). Die Menge des Photoinitiators blieb unverändert. Jeweils 500 µl der Lösung wurden in die Wells einer 12-Well Platte gegeben und unter der Aushärtungslampe Osram Ultra Vitalux zum Hydrogel vernetzt. Die Gele wurden anschließend mit jeweils 500 µl Kulturmedium überschichtet und für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Evaluierung der Biokompatibilität erfolgte nach zweitägiger Kultivierung durch eine Lebend/Tot-Färbung der eingebetteten Zellen mit dem *Live/Dead Viability Kit* (ThermoFisher). Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop. Die Ergebnisse der Färbung sind in Abbildung 101 für jede Hydrogelvariante exemplarisch dargestellt.

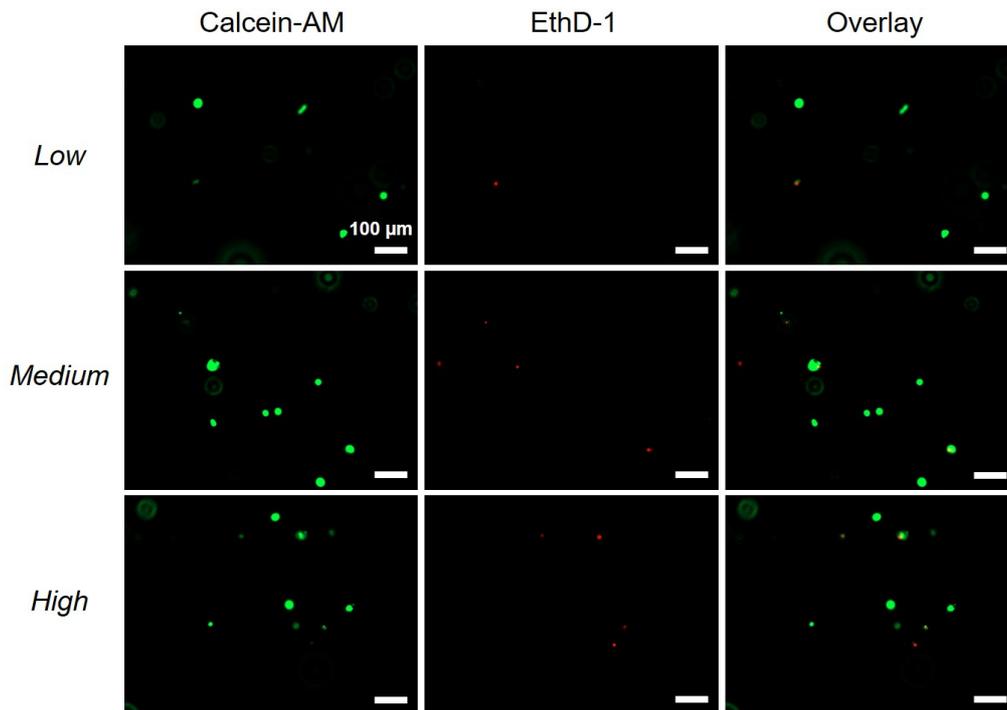


Abbildung 101: Lebend/Tot-Färbung der im Hydrogel GelNB/GelS low, medium und high eingebetteten ASC (5 % GelNB und GelS mit 0,03 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml). Die Färbung mit $2 \mu\text{M}$ Calcein-AM (grün, $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 500-550 \text{ nm}$) und $4 \mu\text{M}$ Ethidium-Homodimer-1 (rot, $\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 600-700 \text{ nm}$) wurde an Tag 2 durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Zeiss Observer Z1, 10x Objektiv/dry). Maßstab: $100 \mu\text{m}$. Erstellt in Kollaboration mit V. Burchak.

Wie in Abbildung 96 zu sehen ist, konnten für alle drei Hydrogelvarianten grüne und somit lebende ASC detektiert werden. In Spalte zwei sind die nekrotischen Zellen dargestellt, welche mit dem Färbereagenz Ethidium-Homodimer-1 gefärbt wurden. Analog zum Propidiumiodid kann dieses Färbereagenz auch nur durch die beschädigte Membran nekrotischer Zellen ins Zellinnere gelangen und interkaliert dort in die DNA der Zellen ein. Für alle drei Gelvarianten waren vereinzelte rote und damit tote Stammzellen zu detektieren. Um die Viabilität der eingekapselten Zellen auch quantitativ zu bestimmen, wurde der Anteil lebender und toter Zellen auf den Bildern manuell bestimmt und daraus die Zellviabilität der ASC in den drei Hydrogelvarianten ermittelt. Diese sind in Abbildung 102 dargestellt.

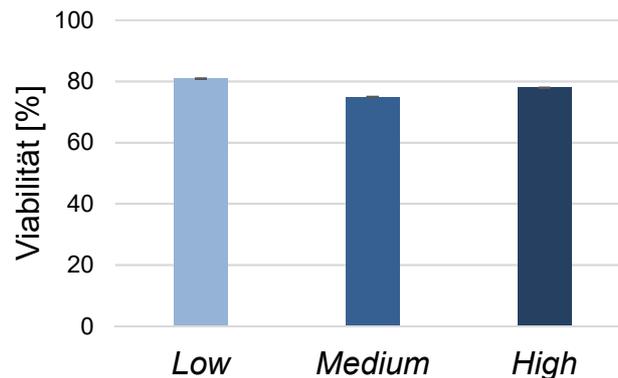


Abbildung 102: Viabilitäten der eingekapselten ASC (2×10^5 Zellen/ml) in den GeINB/GeIS-Hydrogelen low, medium und high (5 % GeINB und GeIS, 0,03 % LAP) nach zweitägiger Kultivierung.

Nach zweitägiger Kultivierung der Stammzellen in den GeINB/GeIS-Hydrogelen konnten für alle drei Varianten Viabilitäten von 70 % bis 80 % ermittelt werden. Die in GeINB/GeIS low eingekapselten ASC wiesen mit 81 % die höchste Viabilität auf. Da die ASC in allen drei Varianten eine hohe Viabilität aufwiesen, konnte daraus geschlossen werden, dass sich der Vernetzungsprozess der Photopolymerlösungen nur gering auf die eingekapselten Zellen auswirkte. Somit konnte in einem ersten Versuch auch eine Eignung der GeINB/GeIS-Hydrogele für die 3D-Kultivierung von adipösen mesenchymalen Stammzellen aufgezeigt werden.

4.6 3D-Biodruck

Um die Reproduzierbarkeit der artifiziellen Gewebemodelle im Bereich des *Tissue Engineering* zu erhöhen, lag der Fokus der Wissenschaft in diesem Bereich in den letzten Jahren auf der Entwicklung und Evaluierung verschiedener 3D-Biodruckverfahren, welche sich zur Generierung von 3D-Strukturen eignen und die natürliche Umgebungsmatrix der Zellen nachbilden.^{271,272} Beim Biodruck werden die Zellen zusammen mit der Stützmatrix als sogenannte Biotinte in einem schichtweisen Verfahren in definierte Strukturen verdruckt.^{70,273} Der große Vorteil dieser Methode liegt in der spatio-temporalen Auflösung verschiedener Zelltypen in einem Konstrukt. Die Wahl der geeigneten Stützmatrix ist dabei für einen erfolgreichen Druckprozess und stabile Gewebekonstrukte von essentieller Bedeutung.^{184,43,274} Diese muss zum einen die mechanischen Anforderungen des Druckprozesses, zum anderen die biologischen Anforderungen der Zellen erfüllen.¹⁸⁴ Um die Eignung der Gelatine-basierten Hydrogele als Biotinten für den 3D-Biodruck zu untersuchen, wurden diese, sowohl mit als auch ohne Zellen, mit Hilfe des 3D-Druckers 3D Discovery Gen1 (regenHU) in einem extrusionsbasierten Verfahren in definierte 3D-Strukturen verdruckt.

4.6.1 Optimierung des Extrusionsdruckprozesses

Zunächst wurde der extrusionsbasierte Druckprozess für die vier Hydrogele *GelMA-V1 medium*, *GelMA-V2 medium*, *GelNB/DTT medium* und *GelNB/GelS medium* optimiert, um stabile Konstrukte mit einer definierten Struktur zu erhalten. Da die flüssigen Photopolymerlösungen eine zu geringe Viskosität und dadurch die gedruckten Strukturen keine Formstabilität aufwiesen, wurden diese zunächst mit Hilfe eines Kühlsystems auf Temperaturen von 12 °C bis 24 °C abgekühlt und anschließend in 1 x 1 cm große Rechteck- und Gitterstrukturen in einem schichtweisen Verfahren auf Glasobjektträger gedruckt. Jede Schicht wurde dabei mit der Aushärtungslampe Osram Ultra Vitalux zum stabilen Hydrogel vernetzt. Dieser Prozess ist schematisch in Abbildung 103 dargestellt.

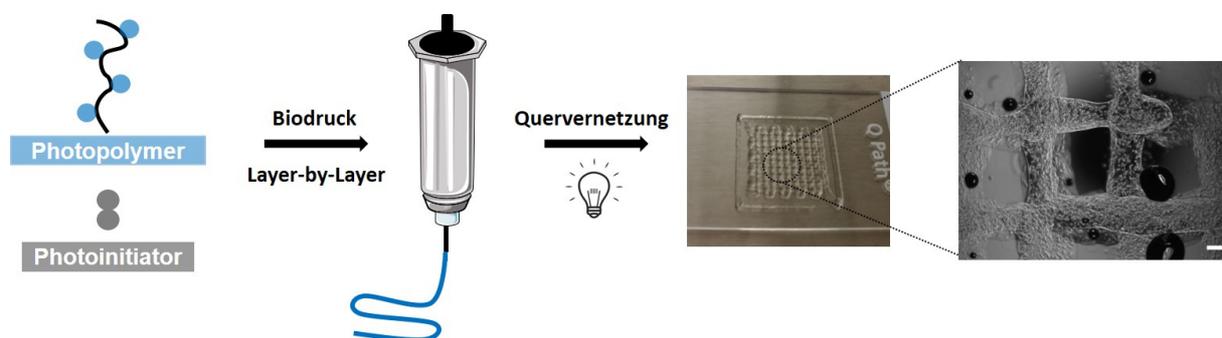


Abbildung 103: Ablauf des 3D-Druckprozesses ohne Zellen. Die flüssige Photopolymerlösung wurde zusammen mit dem Photoinitiator in die Druckerkartusche überführt und der schichtweise Extrusionsdruckprozess gestartet. Nach der Vernetzung wurde die Struktur hinsichtlich ihrer Homogenität und Formstabilität untersucht. Erstellt in Kollaboration mit T. Göckler.¹⁸⁶

Durch das Kühlen der flüssigen Photopolymerlösungen fand eine teilweise Gelierung der Materialien durch die Selbstassemblierung der enthaltenen Kollagenhelices statt, wodurch die Viskosität der Lösungen in den Druckerkartuschen erhöht wurde. Die anschließend gedruckten Strukturen wiesen dadurch eine ausreichende Formstabilität bis zur lichtinduzierten Vernetzung zum stabilen Hydrogel auf. Um die optimalen Drucktemperaturen für jede der vier Photopolymerlösungen zu ermitteln, wurde jede Lösung bei fünf verschiedenen Temperaturen verdruckt.

4.6.1.1 GelMA-V1

Zunächst wurde der extrusionsbasierte Druckprozess für *GelMA-V1 medium* optimiert und die am besten geeignete Drucktemperatur für formstabile, aber gleichzeitig auch homogene Strukturen ermittelt. Dazu wurde die 5%ige flüssige Photopolymerlösung in eine Druckerkartusche überführt und in den Extrusionsdruckkopf des 3D-Biodruckers mit angeschlossenen Kühlsystem eingesetzt. Nachdem das Kühlsystem die gewünschte Temperatur erreicht hatte, wurde die Kartusche für 30 Minuten bei dieser Temperatur inkubiert, um sicherzustellen, dass auch die Photopolymerlösung in der Kartusche die gleiche Temperatur angenommen hatte. Anschließend wurde der Extrusionsdruck so eingestellt, dass ein kontinuierlicher Gelfaden aus

der Kartusche extrudiert wurde. Daraufhin wurde der Druckprozess gestartet. Für GelMA-V1 *medium* wurde die Druckbarkeit der Lösung bei Temperaturen von 16 °C, 18 °C, 20 °C, 22 °C und 24 °C untersucht. Die bei diesen Temperaturen gedruckten Konstrukte sind in Abbildung 104 dargestellt.

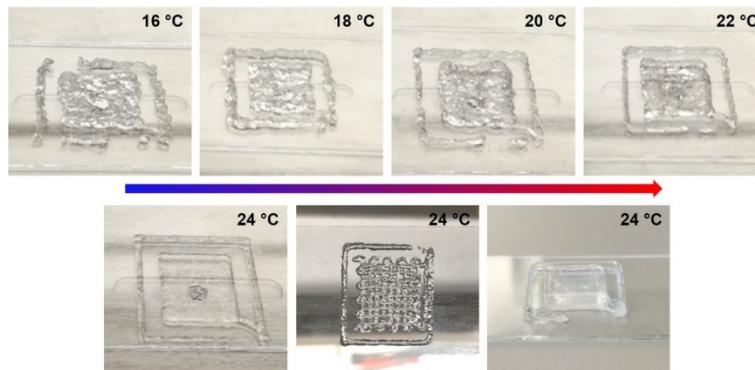


Abbildung 104: Evaluierung verschiedener Drucktemperaturen für 5%iges GelMA-V1 *medium* (0,3 % LAP). Die zugehörigen eingestellten Luftdrücke für eine kontinuierliche Extrusion eines Gelfadens betrugen 0,120 MPa für eine Drucktemperatur von 16 °C, 0,095 MPa für 18 °C, 0,085 MPa für 20 °C, 0,065 MPa für 22 °C und 0,055 MPa für 24 °C. Durchmesser Dosiernadel: 0,15 mm.

Bei einer Drucktemperatur von 16 °C konnte eine formstabile Rechteckstruktur gedruckt werden, diese wies jedoch vereinzelt Lücken auf, und auch eine Homogenität innerhalb der Gelstruktur war nicht zu erkennen. Durch das Abkühlen auf 16 °C gelierte die Photopolymerlösung vollständig und benötigte daher auch einen hohen Extrusionsdruck von 0,120 MPa. Dieser könnte sich bei einem Zelldruck negativ auf die Viabilität der in der Biotinte enthaltenen Zellen auswirken. Auch bei Drucktemperaturen von 18 °C, 20 °C und 22 °C war die Photopolymerlösung zu fest für die Generierung einer homogen gedruckten Struktur. Bei einer Temperatur von 24 °C lag der benötigte Extrusionsdruck bei 0,055 MPa und es konnten homogene und formstabile Strukturen gedruckt werden. Bei dieser Temperatur lag vermutlich nur ein Teil der Kollagenhelices in Form von stabilen Tripelhelices in der Photopolymerlösung vor, wodurch diese zwar fest genug war, um nach dem Druckprozess die Formstabilität der Struktur zu gewährleisten, jedoch auch flüssig genug zur Generierung von homogenen Strukturen. Somit konnten bei einer Temperatur von 24 °C auch definierte Gitterstrukturen oder stabile Konstrukte mit mehreren Schichten gedruckt werden.

4.6.1.2 GelMA-V2

Auch für GelMA-V2 *medium* wurde der Druckprozess optimiert und die am besten geeignete Drucktemperatur für die Generierung formstabiler Konstrukte ermittelt. Die 5%ige Photopolymerlösung wurde in Druckerkartuschen überführt und in den Extrusionsdruckkopf mit geschlossenem Kühlsystem eingesetzt. Nach einer Inkubationsdauer von 30 min bei der gewünschten Temperatur wurde der benötigte Extrusionsdruck manuell eingestellt und der

Druckprozess gestartet. Für GelMA-V2 *medium* wurde die Druckbarkeit der Lösung ebenfalls bei Temperaturen von 16 °C bis 24 °C untersucht. Die bei diesen Temperaturen gedruckten Strukturen sind in Abbildung 105 dargestellt.

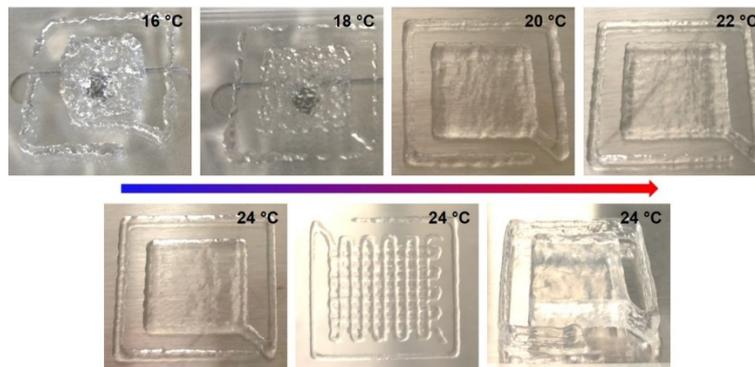


Abbildung 105: Evaluierung verschiedener Drucktemperaturen für 5%iges GelMA-V2 *medium* (0,3 % LAP). Die zugehörigen eingestellten Luftdrücke für eine kontinuierliche Extrusion eines Gelfadens betragen 0,095 MPa für eine Drucktemperatur von 16 °C, 0,070 MPa für 18 °C, 0,055 MPa für 20 °C, 0,050 MPa für 22 °C und 0,045 MPa für 24 °C. Durchmesser Dosiernadel: 0,15 mm.

Wie bereits bei der Optimierung von GelMA-V1 *medium*, wiesen auch die gedruckten GelMA-V2 *medium*-Strukturen bei 16 °C und 18 °C eine Formstabilität auf, jedoch konnte keine Homogenität festgestellt werden, da die Photopolymerlösungen aufgrund vollständiger Tripelhelixbildung zu fest waren. Ab einer Temperatur von 20 °C waren zunehmend glatte und homogene Strukturen zu erkennen, welche zusätzlich eine ausreichende Stabilität aufwiesen. Bei 24 °C konnten definierte Strukturen, wie die in Abbildung 105 dargestellte Gitterstruktur, gedruckt werden. Durch die gleichzeitige Formstabilität war auch ein schichtweiser Druckprozess von mehreren Schichten durchführbar, ohne dass die Struktur kollabierte. Auch der benötigte Extrusionsdruck von 0,045 MPa war sehr gering und sollte sich bei einem Zelldruckprozess nicht auf die Viabilität der Zellen auswirken.

4.6.1.3 GelNB/DTT

Auch für GelNB/DTT *medium* wurde der Druckprozess optimiert und die am besten geeignete Drucktemperatur für die Generierung formstabiler Konstrukte ermittelt. Die 5%ige Photopolymerlösung wurde in Druckerpatronen überführt und in den Extrusionsdruckkopf mit angeschlossenem Kühlsystem eingesetzt. Nach einer Inkubationsdauer von 30 min bei der gewünschten Temperatur wurde der benötigte Extrusionsdruck manuell eingestellt und der Druckprozess gestartet. Dabei wurde die Druckbarkeit der Photopolymerlösung bei Temperaturen von 12 °C, 14 °C, 16 °C, 18 °C und 20 °C untersucht. Die geringeren Drucktemperaturen im Vergleich zu den beiden GelMA-Lösungen wurden aufgrund der stärkeren Löslichkeit der GelNB-Photopolymere gewählt. Die gedruckten Strukturen sind in Abbildung 106 dargestellt.

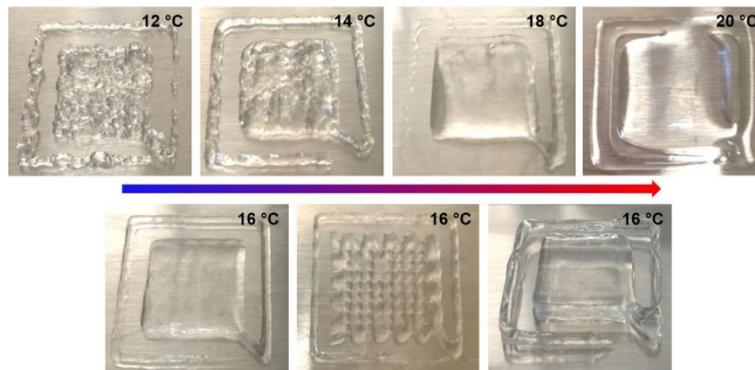


Abbildung 106: Evaluierung verschiedener Drucktemperaturen für 5%iges GeINB/DTT medium (8 mM DTT, 0,03 % LAP). Die zugehörigen eingestellten Luftdrücke für eine kontinuierliche Extrusion eines Gelfadens betragen 0,085 MPa für eine Drucktemperatur von 12 °C, 0,065 MPa für 14 °C, 0,055 MPa für 16 °C, 0,050 MPa für 18 °C und 0,040 MPa für 20 °C. Durchmesser Dosiernadel: 0,15 mm.

Die bei Temperaturen von 12 °C und 14 °C gedruckten Strukturen wiesen eine Formstabilität auf, jedoch konnten keine homogenen und glatten Rechteckstrukturen bei diesen Temperaturen gedruckt werden. Auch hier war die Photopolymerlösung durch die Zusammenlagerung der Tripelhelices zu einem sehr festen Gel ausgelagert, wodurch keine homogenen Strukturen gedruckt werden konnten. Bei 18 °C und 20 °C war die Photopolymerlösung jedoch zu flüssig, um stabile Konstrukte zu bilden. So verliefen die Strukturen teilweise ineinander und auch die für wässrige Lösungen typische Tropfenbildung an der Oberfläche war zu detektieren. Die optimale Drucktemperatur für GeINB/DTT lag bei 16 °C. Bei dieser Temperatur konnten formstabile und homogene Rechteck- und Gitterstrukturen gedruckt werden. Auch ein Druckprozess einer mehrschichtigen Struktur war aufgrund der Formstabilität der GeINB/DTT-Lösung bei dieser Temperatur möglich, ohne dass diese kollabierte. Bei 16 °C lagerte sich nur ein Teil der Kollagenhelices zu den stabilen Tripelhelices zusammen, dadurch war die Photopolymerlösung flüssig genug, um eine homogene Struktur auszubilden. Gleichzeitig verfügte sie über eine ausreichende Festigkeit, sodass die gedruckte Struktur eine ausreichende Formstabilität bis zum Vernetzungsprozess der Lösung zum Hydrogel aufwies.

4.6.1.4 GeINB/GelS

Für GeINB/GelS *medium* wurde der Druckprozess ebenfalls optimiert und die am besten geeignete Drucktemperatur für die Generierung formstabiler Konstrukte ermittelt. Die 5%ige Photopolymerlösung wurde in Druckerkartuschen überführt und in den Extrusionsdruckkopf mit angeschlossenen Kühlsystem eingesetzt. Nach einer Inkubationsdauer von 30 min bei der gewünschten Temperatur wurde der benötigte Extrusionsdruck manuell eingestellt und der Druckprozess gestartet. Dabei wurde die Druckbarkeit der Photopolymerlösung bei Temperaturen von 16 °C bis 24 °C untersucht. Die gedruckten Strukturen sind in Abbildung 107 dargestellt.

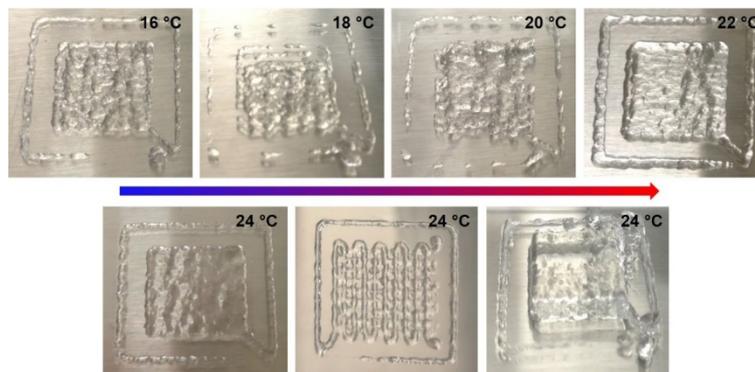


Abbildung 107: *Evaluierung verschiedener Drucktemperaturen für 5%iges GelNB/GelS medium (0,03 % LAP). Die zugehörigen eingestellten Luftdrücke für eine kontinuierliche Extrusion eines Gelfadens betragen 0,120 MPa für eine Drucktemperatur von 16 °C, 0,110 MPa für 18 °C, 0,100 MPa für 20 °C, 0,080 MPa für 22 °C und 0,075 MPa für 24 °C. Durchmesser Dosiernadel: 0,15 mm.*

Die Strukturen, die bei Temperaturen von 16 °C, 18 °C und 20 °C gedruckt wurden, wiesen keine glatte homogene Struktur auf. Zudem waren vereinzelt Lücken in der Struktur zu detektieren. Somit erwiesen sich diese Temperaturen für Druckprozesse mit GelNB/GelS *medium* nicht als geeignet, da die Photopolymerlösung bei diesen Temperaturen zu fest war, um homogene Strukturen zu generieren. Dadurch lag der benötigte Extrusionsdruck bei diesen Temperaturen auch bei 0,120 MPa bis 0,100 MPa. Dieser hohe Druck könnte sich bei Druckprozessen mit Zellen negativ auf deren Viabilität auswirken. Bei 22 °C konnte bereits eine deutlich homogenere Struktur gedruckt werden. Die besten Resultate wurden bei einer Drucktemperatur von 24 °C erzielt. Es konnten homogene und formstabile Rechteck- und Gitterstrukturen gedruckt werden. Auch ein Druckprozess von mehrschichtigen Strukturen war aufgrund der Formstabilität möglich.

Für alle untersuchten Hydrogele konnte ein ähnliches, temperaturabhängiges Druckverhalten detektiert werden. Bei zu geringen Temperaturen waren die Photopolymerlösungen durch die Assemblierung der Tripelhelices zu einem festen Gel ausgeliert, wodurch ein Druck von homogenen Strukturen nicht möglich war. Der Prozess der reversiblen temperaturabhängigen Gelierung ist in Abbildung 108 dargestellt. Bei tiefen Temperaturen lagern sich die einzelnen Polymerketten zu stabilen Tripelhelices zusammen und verfestigen die Polymerlösung. Bei hohen Temperaturen kommt es zur Auflösung der Helices und zur Verflüssigung der Polymerlösung.

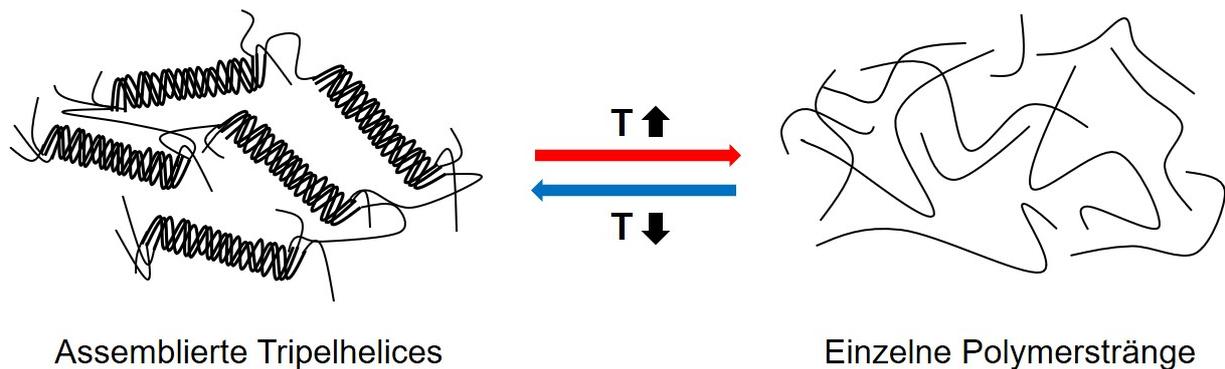


Abbildung 108: Reversible temperaturabhängige Assemblierung der Kollagen-Tripelhelices. Bei tiefen Temperaturen lagern sich die einzelnen Polymerketten zu stabilen Tripelhelices zusammen und verfestigen die Polymerlösung. Bei hohen Temperaturen kommt es zur Auflösung der Helices und zur Verflüssigung der Polymerlösung.

Beim Druckprozess bei zu hohen Temperaturen wiesen die gedruckten Konstrukte aufgrund der Auflösung der Kollagentripelhelices keine Formstabilität mehr auf und begannen zu verlaufen oder zeigten die typische Grenzflächenwölbung. So musste die Temperatur für den Druckprozess so eingestellt werden, dass sich nur ein Teil der Tripelhelices zusammenlagerte und die gedruckten Strukturen dadurch eine ausreichende Stabilität aufwiesen. Gleichzeitig musste die Photopolymerlösung flüssig genug sein, um den Druck von homogenen Strukturen zu gewährleisten. Somit musste sich die Drucktemperatur in der Nähe der Gelierungstemperatur der jeweiligen Photopolymere befinden. Für die beiden GelMA-Hydrogele GelMA-V1 und GelMA-V2 konnte ein identisches Verhalten bei der temperaturabhängigen Druckoptimierung detektiert werden. Bei den beiden Hydrogelen konnten die homogensten und formstabilsten Strukturen bei 24 °C gedruckt werden. Ein durch die unterschiedlichen Funktionalisierungsgrade bedingter Unterschied der Druckbarkeit konnte nicht detektiert werden. Für GelNB/DTT lag die optimale Drucktemperatur bei 16 °C und damit deutlich unter jener von GelMA. Einen Grund dafür könnten die Norbornengruppen des Photopolymers GelNB darstellen. Durch deren Größe könnten sie die Bildung der Tripelhelices sterisch erschweren, wodurch ein Gelierungsprozess erst bei deutlich geringeren Temperaturen ablaufen würde. Somit wurden auch für die Generierung homogener und definierter Strukturen deutlich geringere Temperaturen im Vergleich zu GelMA benötigt. Für GelNB/GelS wurde die optimale Drucktemperatur ebenfalls auf 24 °C festgelegt. Der Effekt der Verlangsamung der Tripelhelices-Bildung konnte nicht detektiert werden. Ein Grund dafür könnte das Photopolymer GelS darstellen. Da bei diesem Polymer die Bildung der Tripelhelices nicht behindert wurde, lag die Gelierungstemperatur deutlich über jener der GelNB/DTT-Photopolymerlösung.

4.6.2 Evaluierung des Scherstress bei Extrusionsdruckprozessen

In einem nächsten Schritt wurde der Einfluss des Extrusionsdruckprozesses und damit des entstehenden Scherstress auf die Viabilität von den drei verschiedenen Zelltypen HepG2, NHDF und HUVEC in Kooperation mit Xenia Kempter (AK Schepers, Institut für funktionelle

Grenzflächen, KIT) und Bruna Regina Maciel (Arbeitsgruppe Angewandte Mechanik, Institut für Mechanische Verfahrenstechnik, KIT) untersucht. Dabei wurden die Zellen im entsprechenden Kulturmedium in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml resuspendiert und in eine Druckerkartusche überführt, die in den Extrusionsdruckkopf des Biodruckers 3D Discovery Gen1 (regenHU) eingesetzt wurde. Anschließend wurde die Lösung durch vier verschiedene Dosiernadeln bei verschiedenen Drücken in Reagenzreservoirs gedruckt und der Anteil nekrotischer Zellen direkt im Anschluss durch eine Färbung der Zellsuspension mit 0,02 mg/ml Propidiumiodid bestimmt. Da das PI nur durch die geschädigte Membran nekrotischer Zellen ins Innere der Zellen eindringen und dadurch die DNA der Zellen rot färben kann, blieben lebende Zellen ungefärbt.²⁵⁶⁻²⁵⁸ Für die Auswertung wurde die gefärbte Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer überführt und der Anteil lebender (ungefärbter) und toter (rot gefärbter) Zellen manuell im Vergleich zu einer nicht-verdruckten Kontroll-Zellsuspension bestimmt. Es wurde der Einfluss von zwei verschieden geformten Dosiernadeln, einer konischen und einer zylindrischen mit jeweils zwei verschiedenen Nadeldurchmessern von 150 μm und 250 μm , auf die Zellviabilität untersucht. Der resultierende Scherstress, der dabei auf die Zellen während des Druckprozesses wirkte, wurde mit Hilfe der Software Ansys Fluent 2019R2 simuliert. Die Simulationsdaten für die konisch und zylindrisch geformte Dosiernadel sind in Abbildung 109 exemplarisch dargestellt.

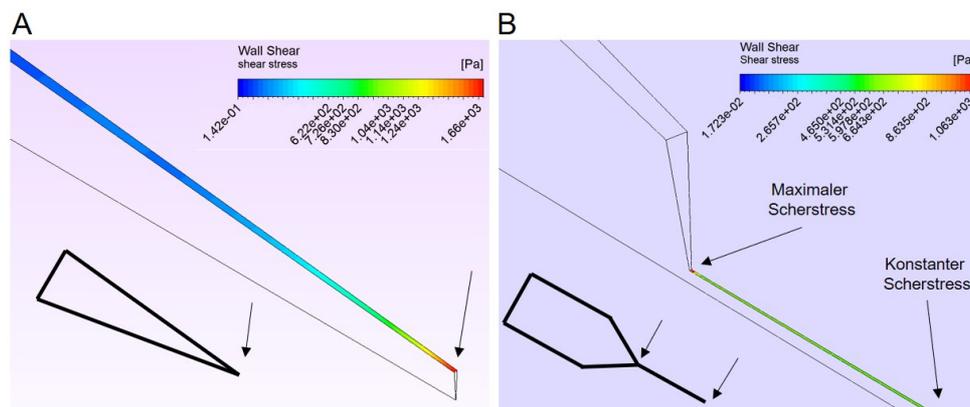


Abbildung 109: Simulation des Scherstress beim Extrusionsdruck von Zellkulturmedium. A: Bei der konischen Nadel werden die maximalen Werte des Scherstress an der Nadelöffnung erhalten. B: Bei der zylindrischen Nadel wird der maximale Scherstress beim Übergang des Nadelreservoirs auf die Metallspitze erzielt. Beim Fluss durch die Metallnadel herrscht ein konstanter Scherstress. Erstellt in Kollaboration mit B. Maciel.

In Teilabbildung A ist die Simulation des Scherstress in einer konisch geformten Dosiernadel exemplarisch dargestellt. Der maximale Scherstress wurde dabei an der Wand der Nadelöffnung detektiert und ist in Rot dargestellt. Für die zylindrisch geformte Dosiernadel wurde der maximale Scherstress beim Übergang des Nadelreservoirs auf die Metalldüse detektiert. Dies ist in Teilabbildung B in Rot dargestellt. Beim Fluss der Lösung durch die Metalldüse und durch deren Öffnung herrschte ein konstanter Scherstress, der deutlich unter dem maximalen Wert lag (in Teilabbildung B grün dargestellt). Die genauen Werte des resultierenden Scherstress

bei verschiedenen Extrusionsdrücken in konisch geformten Nadeln sind in Tabelle 6 dargestellt. Eine Zunahme des Drucks führte zu einer höheren Flussgeschwindigkeit der Zellsuspension und damit zu einem höheren Scherstress. Für die Nadel mit einem Durchmesser von 150 μm lag dabei der Scherstress jeweils um 600 Pa bis 1000 Pa höher als für die Nadel mit einem Durchmesser von 250 μm . Beim größten eingestellten Druck von 0,4 MPa lagen die Werte für den resultierenden Scherstress bei 2747 Pa für die 150 μm Nadel und bei 1690 Pa für die 250 μm Nadel.

Tabelle 6: Resultierender Scherstress in konisch geformten Dosiernadeln bei Druck von Zellkulturmedium mit unterschiedlichen Extrusionsdrücken. Software für Simulation: Ansys Fluent 2019R2.

Druck [MPa]	Scherstress 150 μm Nadel [Pa]	Scherstress 250 μm Nadel [Pa]
0,15	1632	1014
0,2	1904	1179
0,25	2144	1325
0,3	2361	1456
0,35	2561	1577
0,4	2747	1690

Der Einfluss der konischen Nadelgeometrie und des Scherstress während des Druckprozesses auf die Viabilität von verschiedenen verdruckten Zelltypen ist in Abbildung 110 dargestellt. Es wurde die Viabilität von Leberkrebszellen (HepG2), primären Hautfibroblasten (NHDF) und primären Endothelzellen (HUVEC) für zwei verschiedene Nadeldurchmesser bei verschiedenen Extrusionsdrücken ermittelt.

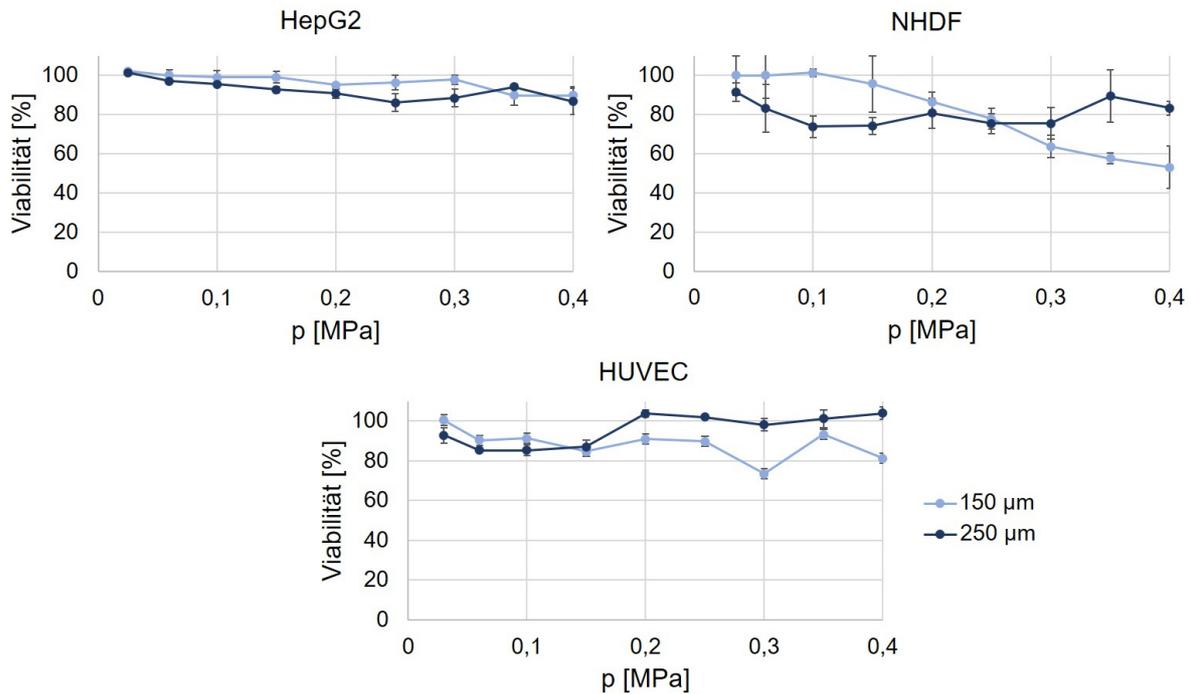


Abbildung 110: Viabilität von HepG2 Zellen, NHDF und HUVEC nach Druckprozess in Zellkulturmedium bei verschiedenen Extrusionsdrücken durch konische Dosiernadeln mit einem Durchmesser von 150 µm und 250 µm.

Bei den HepG2 Zellen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Nadeldurchmessern von 150 µm und 250 µm festgestellt werden. Zusätzlich konnte kein Einfluss des eingestellten Extrusionsdrucks und damit der Flussgeschwindigkeit bzw. des resultierenden Scherstress auf die Viabilität der HepG2 Zellen erkannt werden. Die Viabilität lag sowohl bei sehr geringem Druck von unter 0,1 MPa als auch bei hohem Druck über 0,3 MPa bei 90 % bis 100 %. Somit beeinflussten selbst Scherkräfte von bis zu 2747 Pa die Viabilität der HepG2 Zellen nicht.

Für die NHDF konnte eine eindeutige Abhängigkeit der Zellviabilität vom eingestellten Extrusionsdruck und damit der Flussgeschwindigkeit bzw. dem Scherstress bei einer Nadelöffnung von 150 µm erkannt werden. So sank die Viabilität mit zunehmendem Druck von 100 % auf 50 % ab. Ein Scherstress von 2747 Pa wirkte sich somit sehr stark auf die Viabilität der NHDF aus. Bei der größeren Nadelöffnung konnte keine klare Abhängigkeit der Zellviabilität vom Extrusionsdruck und damit der Flussgeschwindigkeit detektiert werden. Ein Scherstress von 1690 Pa beeinflusste die Viabilität der Zellen somit nicht. Auch für die HUVEC konnte für die getesteten Extrusionsdrücke keine Abhängigkeit der Viabilität vom resultierenden Scherstress detektiert werden. Die Zellviabilität lag für den gesamten Bereich bei 80 % bis 100 %. Somit konnte auch für die HUVEC eine Toleranz für Scherstress-Werte von bis zu 2747 Pa detektiert werden. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Toleranz der drei Zelltypen gegenüber dem auf sie wirkenden Scherstress könnte die Größe der Zellen darstellen. Bei den NHDF

handelt es sich um die größten der drei untersuchten Zelltypen, sodass diese durch die kleine Nadelöffnung von 150 μm und durch den hohen Scherstress von 2747 Pa stärker beschädigt worden sein könnten als die deutlich kleineren HepG2 Zellen und HUVEC. Die simulierten Scherstress-Werte in zylindrisch geformten Dosiernadeln bei unterschiedlichen Extrusionsdrücken sind in Tabelle 7 aufgeführt. Bei diesen wurden zwei Scherstress-Werte detektiert. Am Übergang des Nadelreservoirs auf die Metalldüse wurde der maximale Scherstress detektiert. Beim Fluss durch die Metalldüse und an deren Öffnung blieb der Scherstress konstant und lag unter dem maximalen Wert. Beide Scherstress-Werte nahmen sowohl bei der 150 μm Nadel als auch bei der 250 μm Nadel mit zunehmendem Extrusionsdruck und damit zunehmender Flussgeschwindigkeit zu. Entgegen der Erwartung lagen die Scherstress-Werte für die Nadel mit einem Durchmesser von 250 μm für die meisten Drücke über den Werten der 150 μm Nadel. Beim maximalen getesteten Extrusionsdruck von 0,4 Pa unterschieden sich die Scherstress-Werte allerdings kaum voneinander und lagen für die kleinere Nadel bei 999 Pa und für die Nadel mit dem größeren Durchmesser bei 993 Pa. Insgesamt wiesen die zylindrisch geformten Dosiernadeln jedoch deutlich geringere Scherstress-Werte auf als die konisch geformten.

Tabelle 7: Resultierender Scherstress in zylindrisch geformten Dosiernadeln bei Druck von Zellkulturmedium mit unterschiedlichen Extrusionsdrücken. Software für Simulation: Ansys Fluent 2019R2.

Druck [MPa]	Max. Scherstress 150 μm Nadel [Pa]	Konstanter Scherstress 150 μm Nadel [Pa]	Max. Scherstress 250 μm Nadel [Pa]	Konstanter Scherstress 250 μm Nadel [Pa]
0,15	488	321	-	-
0,2	607	399	648	364
0,25	716	471	744	422
0,3	816	538	837	475
0,35	910	601	917	524
0,4	999	661	993	570

Der Einfluss der zylindrischen Nadelgeometrie und des Scherstress während des Druckprozesses auf die Viabilität der verdruckten HepG2 Zellen, HUVEC und NHDF ist in Abbildung 111 dargestellt. Es wurde die Viabilität der Zellen für zwei verschiedene Nadeldurchmesser bei verschiedenen Extrusionsdrücken ermittelt.

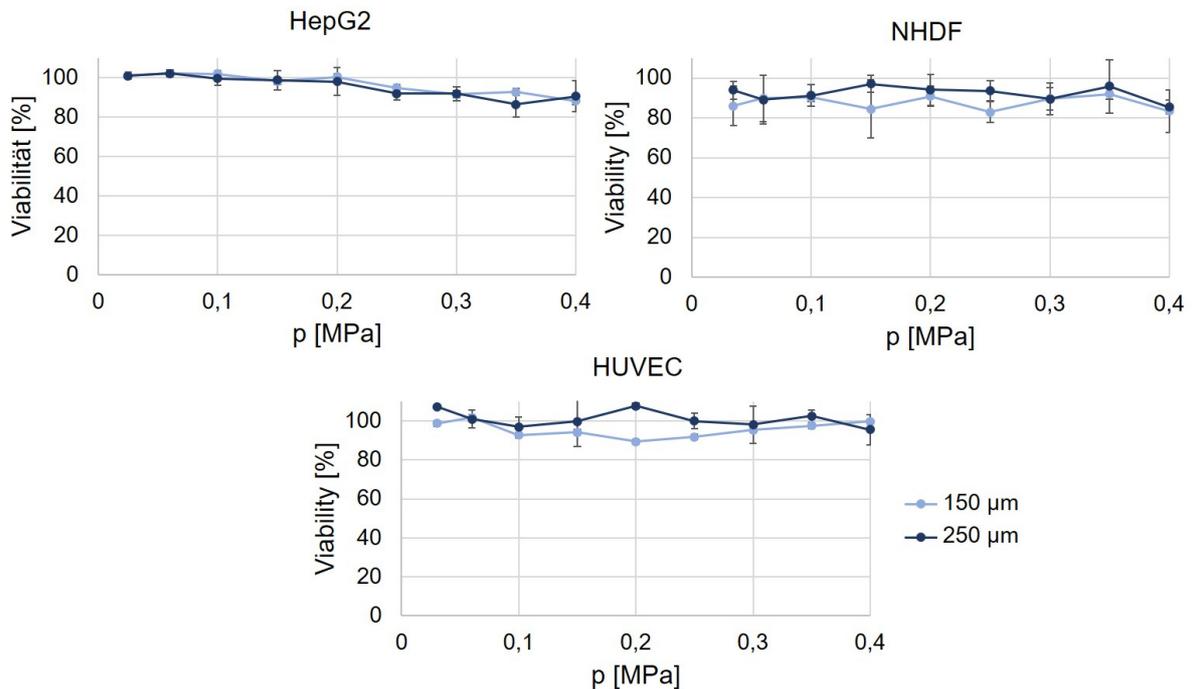


Abbildung 111: Viabilität von HepG2 Zellen, NHDF und HUVEC nach Druckprozess in Zellkulturmedium bei verschiedenen Extrusionsdrücken durch zylindrische Dosiernadeln mit einem Durchmesser von 150 µm und 250 µm.

Bei den HepG2 Zellen konnte, ähnlich wie bei den konischen Nadeln auch, keine signifikante Abnahme der Viabilität mit zunehmendem Extrusionsdruck und damit zunehmendem Scherstress detektiert werden. So lag die Viabilität der Zellen auch bei einem Druck von 0,4 MPa und einem daraus resultierenden maximalen Scherstress von 999 Pa bei 90 %. Ein Unterschied zwischen den beiden Nadeldurchmessern konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Auch bei den NHDF lag die Viabilität für alle eingestellten Drücke bei über 80 %. Eine Abnahme der Viabilität mit steigendem Druck und somit steigendem Scherstress konnte nicht detektiert werden. Auch für die HUVEC konnte keine Abnahme der Viabilität detektiert werden. Selbst bei einem Extrusionsdruck von 0,4 MPa und einem daraus resultierenden Scherstress von 999 Pa lag die Viabilität der Zellen bei über 90 %.

Die Evaluierung, inwieweit die Viabilität von verschiedenen Zelltypen durch einen zunehmenden Scherstress in konischen bzw. zylindrischen Dosiernadeln beeinflusst wird, zeigte, dass lediglich für die großen NHDF eine Abnahme der Viabilität bei hohen Scherstress-Werten von 2747 Pa detektiert werden konnte. Für die anderen Zelltypen konnte keine Abnahme der Zellviabilität mit zunehmendem Scherstress beobachtet werden. Diese erwiesen sich somit als resistent gegenüber Scherstress-Werten von bis zu 2747 Pa. Die ermittelten Scherstress-Werte und deren Einfluss auf die Viabilität der Zellen bezogen sich in diesem Versuch auf den Druck von newtonschen Flüssigkeiten (Zellkulturmedium). Jedoch sollte der Versuch für eine

genauere Untersuchung des auf die Zellen wirkenden Scherstress während des Druckprozesses von Gelatine-basierten Photopolymerlösungen mit viskoserer Flüssigkeiten erweitert werden. Für weitere Biodruckversuche mit zellbeladenen Photopolymerlösungen wurde die konische Nadelform mit einem Durchmesser von 150 μm eingesetzt, da diese nicht so anfällig für eine Materialverstopfung war und eine höhere Auflösung der gedruckten Strukturen erlaubte als die konische Nadel mit einem Durchmesser von 250 μm . Zusätzlich lagen die benötigten Werte für den Extrusionsdruck der Photopolymerlösung bei unter 0,1 MPa (siehe Kapitel 4.6.1) und damit so tief, dass der daraus resultierende Scherstress keinen Einfluss auf die Zellviabilität ausüben sollte. Um dies zu überprüfen, wurden in einem nächsten Schritt die Gelatine-basierten Photopolymerlösungen gemeinsam mit Zellen verdruckt.

4.6.3 Extrusionsdruck zellbeladener Hydrogele

In einem weiteren Schritt wurde die Eignung der Gelatine-basierten Hydrogele als Biotinten anhand des Extrusionsdrucks der zellbeladenen Photopolymerlösungen untersucht. Dabei war die Eignung des GelNB/GelS-Hydrogels von besonderem Interesse, da von Tytgat *et al.* bereits erfolgreich Strukturen mit diesem Hydrogel aufgebaut werden konnten, die Zellen aber erst im Anschluss auf die vernetzten Strukturen ausgesät wurden.²⁰² Für den Extrusionsdruck der zellbeladenen Photopolymerlösungen wurden zunächst primäre Hautfibroblasten in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml in den entsprechenden Photopolymerlösungen resuspendiert und in Druckerkartuschen überführt. Diese wurden anschließend in den Extrusionsdruckkopf des Biodruckers 3D Discovery Gen1 (regenHU) eingesetzt und auf die zuvor ermittelte Drucktemperatur abgekühlt (siehe Kapitel 4.6.1). Anschließend wurde der schichtweise Extrusionsdruckprozess einer vierschichtigen 1 cm x 1 cm großen Gitterstruktur gestartet, wobei nach jeder Schicht ein lichtinduzierter Vernetzungsprozess stattfand. Dieser Vorgang ist schematisch in Abbildung 112 dargestellt. Teilabbildung A zeigt eine fotografische Aufnahme der gedruckten Gitterstruktur und Teilabbildungen B und C eine mikroskopische Hellfeldaufnahme der gedruckten Gitterstrukturen. Durch die Gitterstruktur wurde eine gleichmäßige Versorgung der eingekapselten Zellen mit Nährstoffen sichergestellt. Da die Zellen während des Druckverfahrens einer Vielzahl von potentiell schädlichen Prozessen und Komponenten, wie den Crosslinkern und Photoinitiatoren, dem Scherstress des Extrusionsdrucks und der lichtinduzierten Vernetzung ausgesetzt waren, wurde die Viabilität der eingekapselten NHDF direkt im Anschluss an den Druckprozess (Tag 0), an Tag 7 und an Tag 14 mit Hilfe einer Lebend/Tot-Färbung charakterisiert. Die dadurch grün und rot gefärbte Gitterstruktur ist exemplarisch in Abbildung 112 D dargestellt.

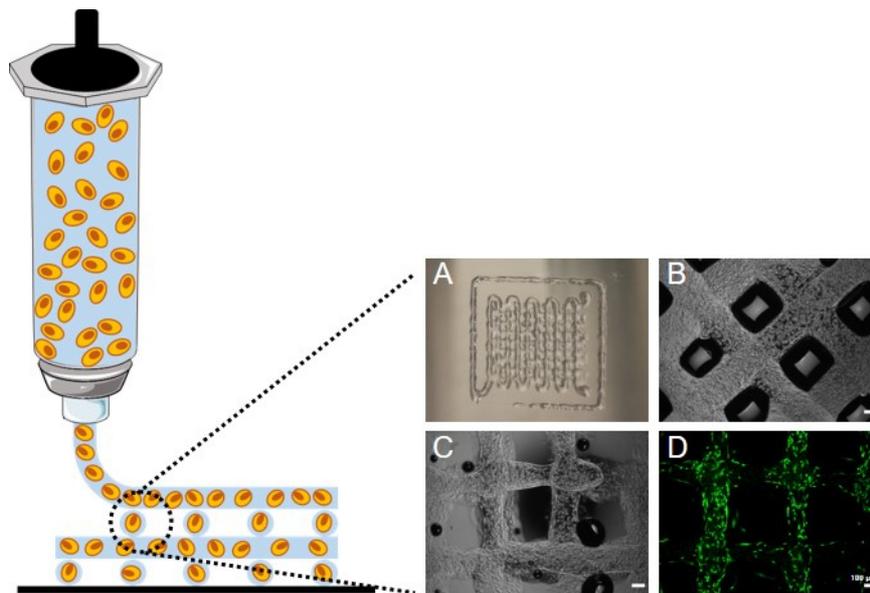


Abbildung 112: Extrusionsdruckprozess von Biotinten mit NHDF zur Generierung einer 1 cm x 1 cm großen Gitterstruktur. **A:** Fotografische Aufnahme der gedruckten Struktur. **B:** Mikroskopische Hellfeldaufnahme der gedruckten Gitterstruktur nach dem Druckprozess (Lichtmikroskop Leica DMIL LED, 4x Objektiv, Maßstab: 100 μm). **C:** Mikroskopische Hellfeldaufnahme der gedruckten Gitterstruktur (Lichtmikroskop Leica DMIL LED, 4x Objektiv, Maßstab: 100 μm). **D:** Zugehörige Fluoreszenzaufnahme der Gelstruktur nach der Lebend/Tot-Färbung der eingekapselten NHDF (Lichtmikroskop Leica DMIL LED, 4x Objektiv, Maßstab: 100 μm). Erstellt in Kollaboration mit T. Göckler.¹⁸⁶

4.6.3.1 GelMA-V2

Zunächst wurden GelMA-V2 *low*-, *medium*- und *high*-Hydrogele als zellbeladene Biotinte gedruckt. Dazu wurde die flüssige Photopolymerlösung mit den NHDF in Druckerpatronen überführt und in den Extrusionsdruckkopf des Biodruckers 3D Discovery Gen1 (regenHU) mit angeschlossenem Kühlsystem eingesetzt. Anschließend wurde der Druckprozess der 1 cm x 1 cm großen Gitterstruktur in einem schichtweisen Druckprozess mit einer 0,15 mm Dosiernadel gestartet, wobei nach jeder Schicht eine Vernetzung mit der Aushärtungslampe Osram Ultra Vitalux für 30 s erfolgte. Anschließend wurde die Struktur mit DPBS⁻ gewaschen und mit Kulturmedium überschichtet. Die Charakterisierung der Zellviabilität erfolgte an Tag 0, Tag 7 und Tag 14 durch eine Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM (4 μM) und Propidiumiodid (0,02 mg/ml). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica TCE SPE). Die Ergebnisse der Färbung sind in Abbildung 113 dargestellt.

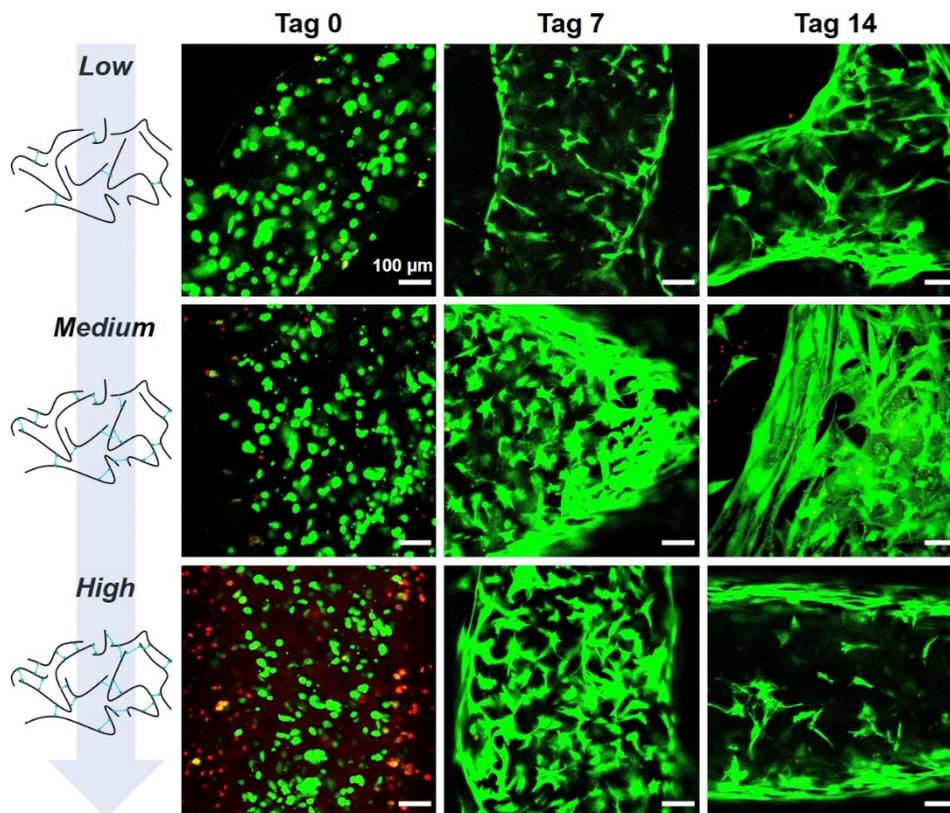


Abbildung 113: Kultivierung und Lebend/Tot-Färbung der gedruckten NHDF mit GelMA-V2 low, medium und high als zugehörige Biotinten (5 % GelMA-V2 mit 0,3 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml). Die Lebend/Tot-Färbung mit $4 \mu\text{M}$ Calcein-AM (grün, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$) und $0,02 \text{ mg/ml}$ Propidiumiodid (rot, $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}650 \text{ nm}$) wurde zu den Zeitpunkten Tag 0, Tag 7 und Tag 14 nach dem Extrusionsdruckprozess durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5). Maßstab: $100 \mu\text{m}$.

Direkt im Anschluss an den Druckprozess wiesen die gedruckten NHDF in allen drei GelMA-V2-Varianten eine runde Morphologie auf. Nach 7-tägiger Kultivierung der Strukturen konnte in allen drei Varianten jedoch bereits eine deutliche Ausrichtung und Elongation der eingekapselten NHDF detektiert werden. Auch an Tag 14 war dieser Effekt zu beobachten, zusätzlich zur Elongation der Zellen war auch eine interzelluläre Netzwerkbildung innerhalb der gedruckten Gitterstruktur festzustellen. Besonders stark trat dieser Effekt am Rand der gedruckten Gelfasern auf. Dadurch ließ sich vermuten, dass die Ausrichtung der Zellen von der Geometrie der Struktur beeinflusst wurde. Zusätzlich wirkte sich die starke interzelluläre Vernetzung der NHDF am Rand der Gelfasern vermutlich auch auf die Stabilität der Faser aus, da sie für eine zusätzliche Vernetzung sorgte. Zu allen Zeitpunkten war ein großer Anteil grüner und damit lebender Zellen erkennbar. Lediglich direkt nach dem Druckprozess wurden bei GelMA-V2 *high* vermehrt rote und damit tote Zellen detektiert. Die Viabilität der eingekapselten NHDF wurde zu jedem Zeitpunkt für alle drei Gelvarianten mit Hilfe einer Bildauswertungs-Software ermittelt und ist in Abbildung 114 dargestellt.

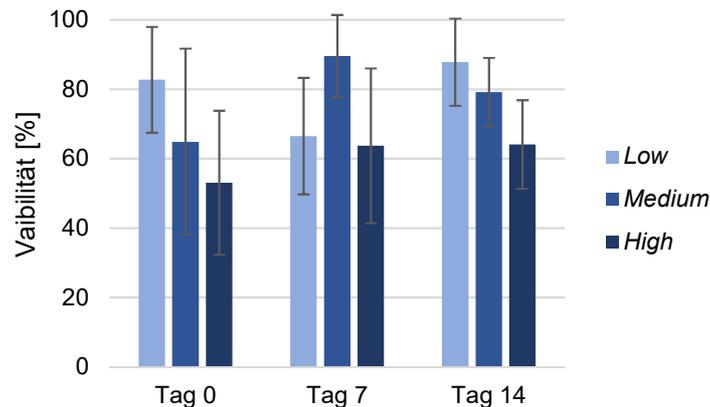


Abbildung 114: Viabilität der im Hydrogel GelMA-V2 low, medium und high (5 % GelMA-V2, 0,3 % LAP) gedruckten NHDF an Tag 0, Tag 7 und Tag 14 nach dem Extrusionsdruckprozess.

Die Viabilität der NHDF an Tag 0 direkt nach dem Druckprozess lag bei 83 % für GelMA-V2 *low*, 65 % für GelMA-V2 *medium* und 53 % für GelMA-V2 *high*. Die Abnahme der Viabilität mit zunehmendem Funktionalisierungsgrad der Photopolymere könnte auf der Kreuzreaktion der Methacrylamidgruppen mit Zellkomponenten beruhen. Die endständigen Doppelbindungen der Methacrylamidgruppen der GelMA-Photopolymere sind hochreaktiv und können auch mit Komponenten der Zellmembran reagieren, was einen negativen Einfluss auf die Viabilität der Zellen haben könnte. Da die Zellen über einen längeren Zeitraum der nicht-vernetzten Photopolymerlösung in der Druckerkartusche ausgesetzt waren konnten die einzelnen Komponenten wie Methacrylamidgruppen und der Photoinitiator einen toxischen Effekt auf die Zellen ausgeübt haben. Im Laufe der Kultivierungszeit stieg die Viabilität für alle drei Gelvarianten wieder an und lag an Tag 14 bei 88 % für *low*, 78 % für *medium* und 65 % für *high*. Um eine gleichmäßige Verteilung der eingekapselten NHDF in den gedruckten Gitterstrukturen zu überprüfen, wurden mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica TCE SPE) Z-Stack Aufnahmen der Gele mit einer Höhe von 300 µm aufgezeichnet und anschließend mit der Software Leica LasX in 3D-Bilder rekonstruiert und eine Tiefenfärbung der eingekapselten NHDF in den verschiedenen Gelvarianten zu den verschiedenen Zeitpunkten erstellt. Diese Tiefenfärbungen sind in Abbildung 115 dargestellt, die zugehörigen 3D-Rekonstruktionen der Lebend/Tot-Färbung sind im Anhang in Abbildung 131 dargestellt.

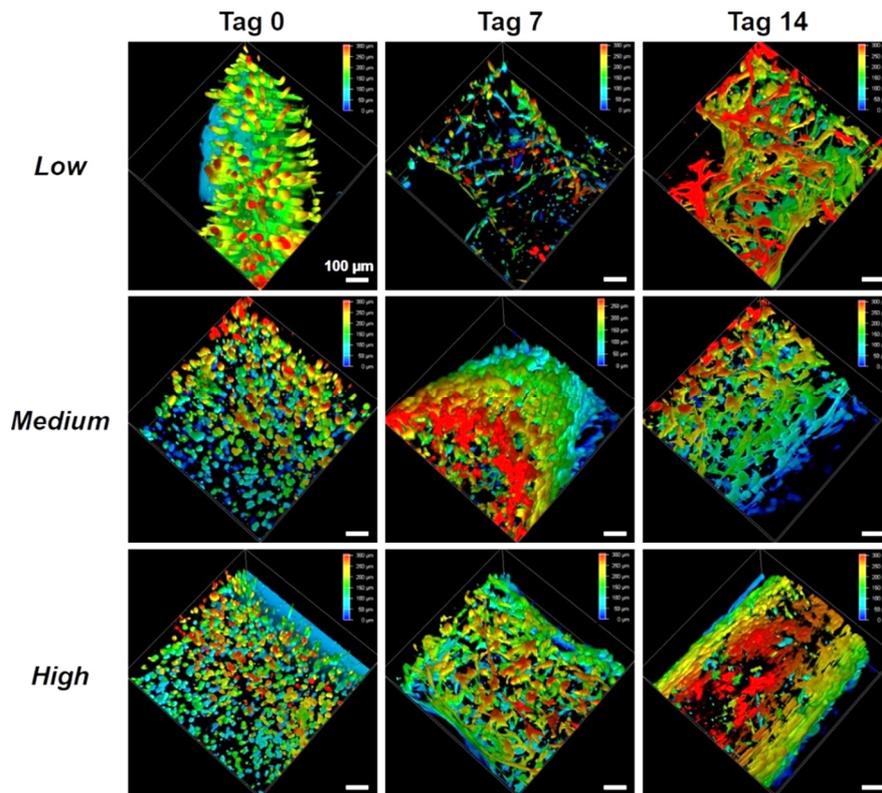


Abbildung 115: Tiefenfärbung der gedruckten NHDF mit GeIMA-V2 low, medium und high als zugehörige Biotinten (5 % GeIMA-V2 mit 0,3 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) zu den Zeitpunkten Tag 0, Tag 7 und Tag 14. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: 300 µm, Schrittgröße 5 µm). Die 3D-Rekonstruktion und Tiefenfärbung erfolgte mit der Leica LasX-Software. Skalierung der Tiefenfärbung: 50 µm, blau: 0 µm, rot: 300 µm. Maßstab: 100 µm.

Für den gesamten Kultivierungszeitraum war eine gleichmäßige Verteilung der NHDF innerhalb der gedruckten Gitterstruktur zu erkennen. Zusätzlich konnte die Ausrichtung der Zellen auch in den rekonstruierten 3D-Bildern in allen Schichten deutlich detektiert werden. Besonders nach einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen war die starke interzelluläre Vernetzung der NHDF sowohl innerhalb der Gitterstruktur als auch am Rand der gedruckten Gelfasern zu beobachten.

4.6.3.2 GeINB/DTT

In einem nächsten Schritt wurde die Eignung des GeINB/DTT-Gels in den Varianten *low*, *medium* und *high* als zellbeladene Biotinte untersucht. Dazu wurde die flüssige Photopolymerlösung mit den NHDF in Druckerkartuschen überführt und in den Extrusionsdruckkopf des Biodruckers 3D Discovery Gen1 (regenHU) mit angeschlossenen Kühlsystem eingesetzt. Anschließend wurde der Druckprozess der 1 cm x 1 cm großen Gitterstruktur in einem schichtweisen Druckprozess gestartet, wobei nach jeder Schicht eine Vernetzung mit der Aushärtungslampe Osram Ultra Vitalux für 20 s erfolgte. Anschließend wurde die Struktur mit DPBS-

gewaschen und mit Kulturmedium überschichtet. Die Charakterisierung der Zellviabilität erfolgte an Tag 0, Tag 7 und Tag 14 durch eine Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM (4 μM) und Propidiumiodid (0,02 mg/ml). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica TCE SPE). Die Ergebnisse der Färbung sind in Abbildung 116 dargestellt.

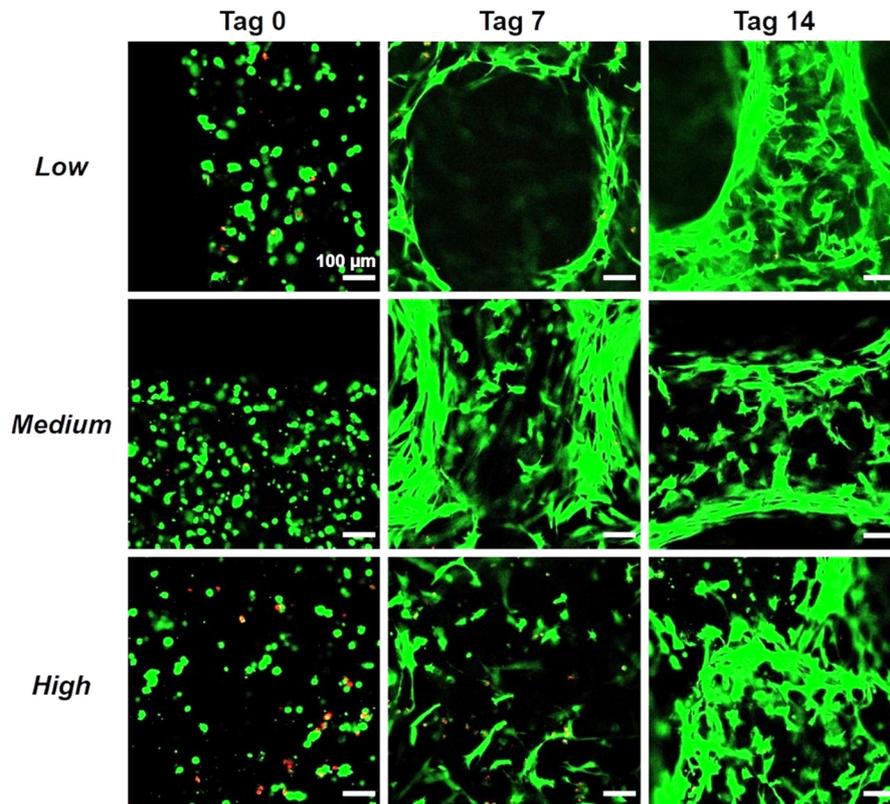


Abbildung 116: Kultivierung und Lebend/Tot-Färbung der gedruckten NHDF mit GeINB/DTT low, medium und high als zugehörige Biotinten (5 % GeINB mit 5,4 mM, 8mM oder 15 mM DTT und mit 0,03 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml). Die Lebend/Tot-Färbung mit 4 μM Calcein-AM (grün, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$) und 0,02 mg/ml Propidiumiodid (rot, $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}650 \text{ nm}$) wurde zu den Zeitpunkten Tag 0, Tag 7 und Tag 14 nach dem Extrusionsdruckprozess durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5). Maßstab: 100 μm .

Direkt im Anschluss an den Druckprozess wiesen die eingekapselten NHDF wie erwartet eine runde Morphologie auf. Nach einer Kultivierungsdauer von 7 Tagen konnten in allen drei GeINB/DTT-Varianten elongierte und spindelförmige Zellen detektiert werden. Besonders stark war dieser Effekt bereits am Rand der einzelnen Gelfäden zu erkennen. Auch nach 14 Tagen blieben die gedruckten Gitterstrukturen stabil und die eingekapselten NHDF Zellen bildeten interzelluläre Netzwerke aus, die sich durch die gesamte Gitterstruktur zogen. Ein Einfluss des Vernetzungsgrads der drei Gelvarianten auf die Ausrichtung und Netzwerkbildung der NHDF war nicht zu festzustellen. Zu allen Zeitpunkten war ein großer Anteil grüner und damit lebender Zellen zu detektieren. Die Viabilität der eingekapselten NHDF wurde zu jedem

Zeitpunkt für alle drei Gelvarianten mit Hilfe einer Software zur Bildauswertung quantitativ ermittelt und ist in Abbildung 117 dargestellt.

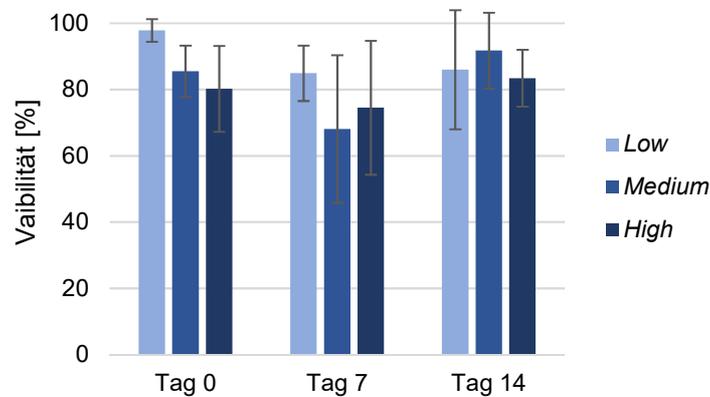


Abbildung 117: Viabilität der im Hydrogel GelNB/DTT low, medium und high (5 % GelNB, 5,4 mM, 8 mM oder 15 mM DTT, 0,03 % LAP) gedruckten NHDF an Tag 0, Tag 7 und Tag 14 nach dem Extrusionsdruckprozess.

Direkt nach dem Druckprozess lag die Viabilität der eingekapselten NHDF in den drei Varianten *low*, *medium* und *high* bei 80 % bis 97 % und damit deutlich höher als die Viabilität der eingekapselten Zellen in den GelMA-Varianten. Die leichte Abnahme der Viabilität mit zunehmendem Funktionalisierungsgrad des GelNB könnte auf der zugesetzten Menge des Crosslinkers DTT beruhen. So musste für eine erfolgreiche Vernetzung für die *high*-Variante DTT in einer Konzentration von 15 mM zugesetzt werden, für *low* lediglich in einer Konzentration von 5,4 mM. Da die Zellen während des Druckprozesses in der Photopolymerlösung deutlich länger bis zur Vernetzung vorlagen, könnte das DTT einen toxischen Effekt auf die NHDF ausgeübt haben. Die Viabilität der Zellen sank im Verlauf der Kultivierung an Tag 7 etwas ab, lag aber an Tag 14 für alle drei Varianten bei 82 % bis 91 %. Um eine gleichmäßige Verteilung der eingekapselten NHDF in den gedruckten Gitterstrukturen zu überprüfen, wurden mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica TCE SPE) Z-Stack Aufnahmen der Gele mit einer Höhe von 300 µm aufgezeichnet, anschließend mit der Software Leica LasX in 3D-Bilder rekonstruiert und eine Tiefenfärbung der eingekapselten NHDF in den verschiedenen Gelvarianten zu den verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Diese Tiefenfärbungen sind in Abbildung 118 dargestellt, die zugehörigen 3D-Bilder der Lebend/Tot-Färbung sind im Anhang in Abbildung 132 dargestellt.

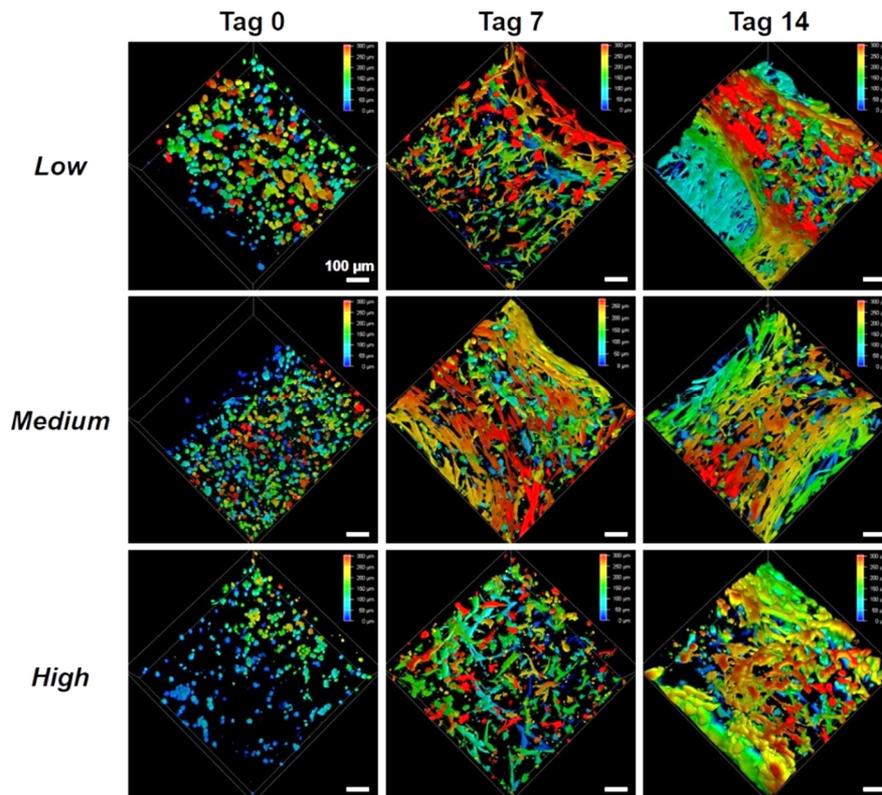


Abbildung 118: Tiefenfärbung der gedruckten NHDF mit GeINB/DTT low, medium und high als zugehörige Biotinten (5 % GeINB mit 5,4 mM, 8mM oder 15 mM DTT und mit 0,03 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) zu den Zeitpunkten Tag 0, Tag 7 und Tag 14. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: 300 μm , Schrittgröße 5 μm). Die 3D-Rekonstruktion und Tiefenfärbung erfolgte mit der Leica LasX-Software. Skalierung der Tiefenfärbung: 50 μm , blau: 0 μm , rot: 300 μm . Maßstab: 100 μm .

Die Tiefenfärbung der eingekapselten NHDF zeigte eine gleichmäßige Verteilung über den gesamten Kultivierungszeitraum auf. Zusätzlich war die starke Netzwerkbildung der Zellen an Tag 14 auch auf den 3D-Bildern deutlich zu erkennen. Das dichte Zellnetzwerk zog sich durch alle Ebenen der gedruckten Gitterstrukturen. In der *low*-Variante waren zusätzlich auch Zellen am Boden des Glasslides zu erkennen, was an einer starken Proliferation der Zellen liegen könnte, wodurch sie aus der Gitterstruktur herauswuchsen.

4.6.3.3 GeINB/GeIS

Auch GeINB/GeIS wurde in den drei Varianten *low*, *medium* und *high* mit NHDF als Biotinte verdruckt, um die Eignung des Materials als Tinte für extrusionsbasierte Druckprozesse zu untersuchen. Dazu wurde die flüssige Photopolymerlösung mit den NHDF in Druckerkartuschen überführt und in den Extrusionsdruckkopf des Biodruckers 3D Discovery Gen1 (regenHU) mit angeschlossenem Kühlsystem eingesetzt. Anschließend wurde der schichtweise

Druckprozess der 1 cm x 1 cm großen Gitterstruktur, wobei nach jeder Schicht eine Vernetzung mit der Aushärtungslampe Osram Ultra Vitalux für 20 s erfolgte. Anschließend wurde die Struktur mit DPBS⁻ gewaschen und mit Kulturmedium überschichtet. Die Charakterisierung der Zellviabilität erfolgte an Tag 0, Tag 7 und Tag 14 durch eine Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM (4 μ M) und Propidiumiodid (0,02 mg/ml). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica TCE SPE). Die Ergebnisse der Färbung sind in Abbildung 119 dargestellt.

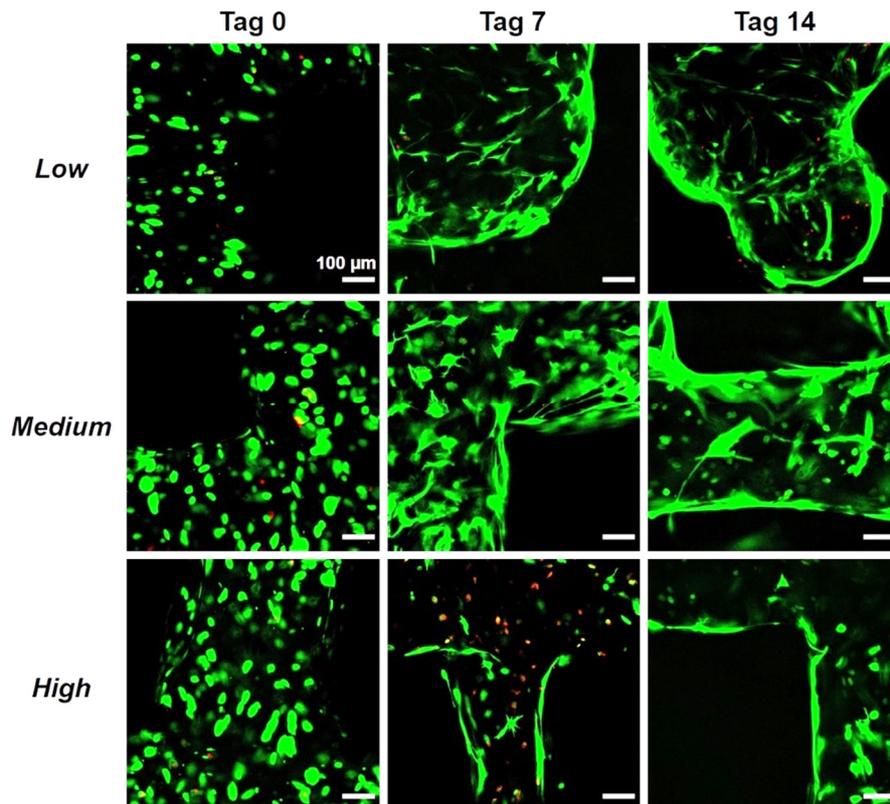


Abbildung 119: Kultivierung und Lebend/Tot-Färbung der gedruckten NHDF mit GelNB/GelS low, medium und high als zugehörige Biotinten (5 % GelNB, 5 % GelS mit 0,03 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml). Die Lebend/Tot-Färbung mit 4 μ M Calcein-AM (grün, $\lambda_{ex} = 488$ nm, $\lambda_{em} = 500-550$ nm) und 0,02 mg/ml Propidiumiodid (rot, $\lambda_{ex} = 532$ nm, $\lambda_{em} = 550-650$ nm) wurde zu den Zeitpunkten Tag 0, Tag 7 und Tag 14 nach dem Extrusionsdruckprozess durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5). Maßstab: 100 μ m.

Auch bei diesen Gelen wiesen die NHDF direkt nach dem Druckprozess noch eine runde Zellmorphologie auf. Nach einer Kultivierungsdauer von 7 Tagen hatte sich diese jedoch deutlich geändert. Die Zellen wiesen nun eine elongierte, spindelförmige Morphologie auf. Zusätzlich war eine beginnende interzelluläre Netzwerkbildung bereits zu detektieren. An Tag 14 waren besonders am Rand der Gelfasern dichte Netzwerke der NHDF zu erkennen, sodass auch hier vermutet wurde, dass die Geometrie der gedruckten Struktur die Elongation und Ausrich-

tung der Zellen beeinflusste. Zu allen Zeitpunkten war ein großer Anteil grüner und damit lebender Zellen zu erkennen, lediglich für die *high*-Variante waren an Tag 7 auch einige rote und damit tote Zellen zu detektieren. Die Viabilität der eingekapselten NHDF wurde zu jedem Zeitpunkt für alle drei Gelvarianten mit Hilfe einer Bildauswertungs-Software quantitativ ermittelt und ist in Abbildung 120 dargestellt.

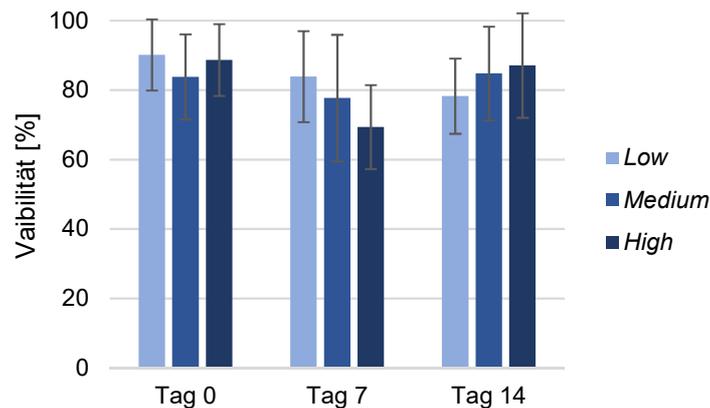


Abbildung 120: Viabilität der im Hydrogel GeINB/GelS low, medium und high (5 % GeINB, 5 % GelS mit 0,03 % LAP) gedruckten NHDF an Tag 0, Tag 7 und Tag 14 nach dem Extrusionsdruckprozess.

Die Viabilität der eingekapselten NHDF lag an Tag 0 direkt nach dem Druckprozess für alle drei GeINB/GelS-Varianten bei über 80 %. Somit konnte kein starker Einfluss des Druckprozesses auf die Viabilität der NHDF detektiert werden. Im weiteren Kultivierungsverlauf sank die Viabilität der NHDF an Tag 7 auf unter 80 % ab, lag aber an Tag 14 für alle drei Gelvarianten wieder bei ca. 80 %. Um eine gleichmäßige Verteilung der eingekapselten NHDF in den gedruckten Gitterstrukturen zu überprüfen, wurden mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica TCE SPE) Z-Stack Aufnahmen der Gele mit einer Höhe von 300 µm aufgezeichnet und anschließend mit der Software Leica LasX in 3D-Bilder rekonstruiert und eine Tiefenfärbung der eingekapselten NHDF in den verschiedenen Gelvarianten zu den verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Diese Tiefenfärbungen sind in Abbildung 121 dargestellt, die zugehörigen 3D-Bilder der Lebend/Tot-Färbung sind im Anhang in Abbildung 133 dargestellt.

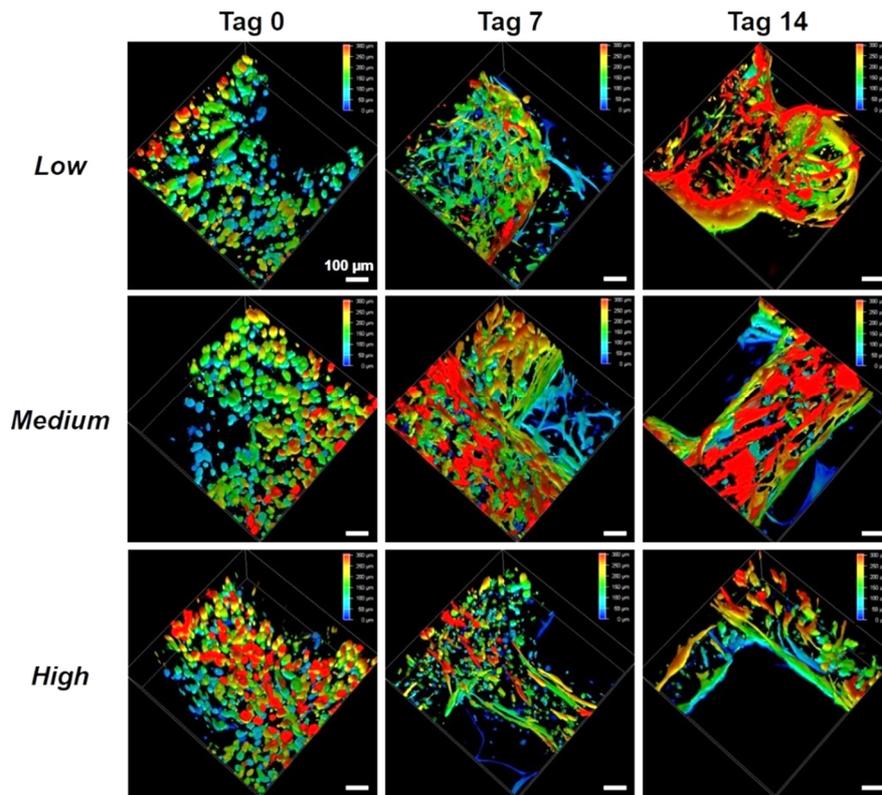


Abbildung 121: Tiefenfärbung der gedruckten NHDF mit GeINB/GelS low, medium und high als zugehörige Biotinten (5 % GeINB, 5 % GelS mit 0,03 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) zu den Zeitpunkten Tag 0, Tag 7 und Tag 14. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: 300 µm, Schrittgröße 5 µm). Die 3D-Rekonstruktion und Tiefenfärbung erfolgte mit der Leica LasX-Software. Skalierung der Tiefenfärbung: 50 µm, blau: 0 µm, rot: 300 µm. Maßstab: 100 µm.

Die Tiefenfärbung der NHDF zeigte über den gesamten Kultivierungszeitraum eine gleichmäßige Verteilung der Zellen innerhalb der gedruckten Gitterstruktur auf. Die rekonstruierten 3D-Bilder verdeutlichen zudem nochmals die interzelluläre Netzwerkbildung der NHDF nochmals. So durchzog das Zellnetzwerk bereits ab Tag 7 die gedruckten Gitterstrukturen. Besonders ausgeprägt waren diese am Rand der Gelfasern und sorgten dadurch vermutlich für eine zusätzliche Stabilität der gedruckten Struktur.

Insgesamt konnte ein Einfluss des extrusionsbasierten Druckprozesses auf die Viabilität der NHDF nur bei GelMA-V2 detektiert werden. Ein möglicher Grund dafür könnte die Kreuzreaktion der Methacrylamidgruppen mit Zellkomponenten darstellen, weshalb dieser Effekt auch verstärkt bei dem hochfunktionalisierten GelMA-V2 *high* auftrat. Zusätzlich verläuft der Vernetzungsprozess über eine radikalische Kettenpolymerisation, bei der vermehrt freie Radikale freigesetzt werden und auch eine größere Menge des Photoinitiators LAP zugesetzt werden muss. Beides könnte auch einen negativen Einfluss auf die Viabilität der Zellen ausüben. Im Vergleich zu GelMA-V2 lagen die Viabilitäten der NHDF in den GeINB/DTT- und GeINB/GelS-

Gelen direkt im Anschluss an den Druckprozess sowie nach einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen bei über 80 %. Eine Veränderung der Morphologie der eingekapselten Zellen im Verlauf der Kultivierung war für alle drei Gelatine-basierten Hydrogele zu erkennen. Aufgrund der natürlich vorhandenen RGD-Domänen konnten sich die Zellen über ihre Integrinrezeptoren an die Umgebungsmatrix anheften, sodass bereits an Tag 7 spindelförmige und elongierte Fibroblasten beobachtet werden konnten. Zusätzlich war eine erste interzelluläre Netzwerkbildung innerhalb der gedruckten Strukturen zu erkennen, welche sich nach einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen nochmals deutlich verstärkte. Dies trat besonders am Rand der Gelfasern auf. Die NHDF richteten sich vermehrt an der longitudinalen Achse der gedruckten Gelfaser aus, sodass die Geometrie der gedruckten Struktur einen Einfluss auf die Ausrichtung der Zellen ausübte. Dies sorgte vermutlich für eine zunehmende Stabilität der Fasern. Ein Einfluss des Vernetzungsgrads der Hydrogelvarianten *low*, *medium* und *high* auf die Morphologie der NHDF konnte für alle drei Gelatine-basierten Hydrogele im Gegensatz zu den Biokompatibilitätsuntersuchungen der 3D-Einbettung von Zellen nicht festgestellt werden. Zusätzlich waren die gedruckten Gelstrukturen deutlich stabiler. Ein Auflösen der Gele war im Gegensatz zu den Gelen mit eingebetteten Zellen nicht festzustellen. Ein Grund dafür könnte die zusätzliche Netzwerkbildung der NHDF darstellen, die die Gele nochmals zusätzlich stabilisierte. Zudem wurde für die lichtinduzierte Vernetzung nach dem Druckprozess eine andere Aushärtungslampe verwendet. Da diese auch Licht im UV-Bereich ausstrahlte, das dem Absorptionsmaxima des LAP-Photoinitiators entsprach, könnten die Hydrogele stärker vernetzt worden sein.

4.6.4 3D-Druck zum Aufbau eines Blut-Hirn-Schranke-Modells auf einem *Organ-on-a-Chip* System

In einem nächsten Schritt wurde durch Einsatz der Gelatine-basierten Hydrogele und des optimierten Extrusionsdruckprozesses ein *in vitro* Gewebemodell der Blut-Hirn-Schranke (BBB, engl.: *blood brain barrier*) auf dem im Arbeitskreis entwickelten *Organ-on-a-Chip* System *vasQchip* aufgebaut. Dies wurde in Kooperation mit Rebecca Pfister (AK Schepers, Institut für funktionelle Grenzflächen, KIT) durchgeführt.²⁰⁹

Die BBB ist eine dichte physikalische, metabolische und biochemische Barriere des Gehirns und reguliert den selektiven Stofftransport zwischen der Blutbahn und dem Nervengewebe des Gehirns.²⁷⁵ Neben der Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen schützt sie dieses vor Schwankungen der Ionenkonzentration, welche die synaptischen Wechselwirkungen negativ beeinflussen können.²⁷⁶ Die BBB ist aus Endothelzellen, Perizyten, Astrozyten und Neuronen aufgebaut.²⁷⁷ Die Endothelzellen sind durch *Tight Junctions* und *Adherens Junctions* sehr eng miteinander verknüpft und sorgen so für die starke Barrierefunktion der BBB. Zusätzlich sind sie mit Transportsystemen ausgestattet, die eingedrungene Moleküle zurück in die Blutbahn transportieren können.²⁷⁸ Dadurch kontrolliert das Endothel die Permeabilität und den Stofftransport zwischen der Blutbahn und dem Hirngewebe.²⁷⁹ Perizyten, welche ein Bestandteil der neurovaskulären Einheit sind und zu den Wandzellen zählen, befinden sich direkt neben den Endothelzellen.²⁸⁰ Die Astrozyten bilden dann den Verknüpfungspunkt zwischen den

Neuronen und den Endothelzellen.²⁸¹ Sie sind unter anderem für die Aufrechterhaltung der Homöostase von Ionen, Neurotransmittern und Wasser zuständig und üben eine verstärkende Wirkung auf die Ausbildung der *Tight Junctions* des Hirnendothels aus.^{277,282,283} Somit sind sowohl die Astrozyten als auch die Perizyten für eine korrekte Bildung und Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke notwendig.^{284,285} Die geringe Durchlässigkeit der BBB für Moleküle stellt Wissenschaftler bei der Behandlung von neurologischen Krankheiten vor große Herausforderungen, da eine direkte Injektion von Wirkstoffen ins Gehirn nicht möglich ist, und deren Aufnahme über die Blutbahn und die BBB erfolgen muss.^{286,287} Somit ist die Generierung von *in vitro* Modellen der Blut-Hirn-Schranke zur Untersuchung deren Funktion und Eigenschaften für die pharmazeutische Forschung von enormer Bedeutung. Der gleichzeitige Einsatz von *Organ-on-a-Chip* Systemen und des 3D-Biodrucks erlaubt dabei nicht nur die Nachstellung des Hirnendothels und des Blutflusses, sondern auch die präzise Platzierung der umliegenden Zellen. In diesem Versuch zum Aufbau der BBB wurden deshalb die Perizyten und Astrozyten gezielt mit Hilfe des extrusionsbasierten 3D-Biodrucks um den porösen PC-Mikrokanal des vasQchips in einer 3D-Struktur platziert. Dies ist in Abbildung 122 schematisch dargestellt. Anschließend wurde der Mikrokanal mit spezifischen Zellen des Hirnendothels ausgekleidet und der Chip an die Mikrofluidik angeschlossen, um den Blutfluss durch die BBB nachzubilden.

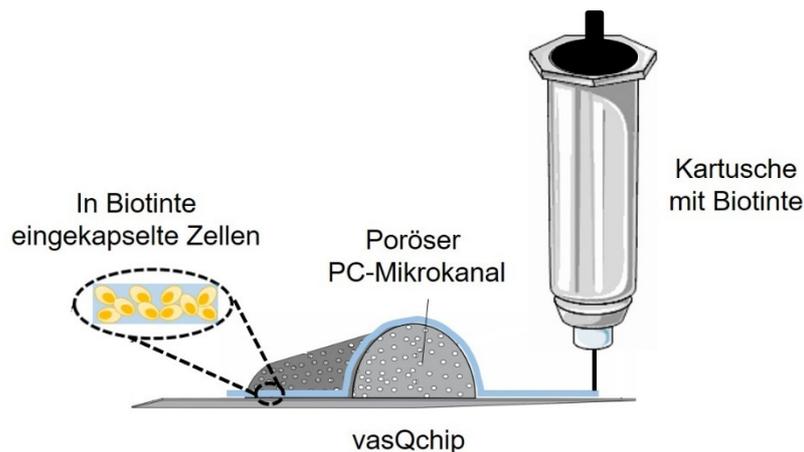


Abbildung 122: Schematische Darstellung des extrusionsbasierten Druckprozesses auf den vasQchip. Die Zellen wurden in den Gelatine-basierten Photopolymerlösungen resuspendiert und als Biotinte anschließend ins untere Kompartiment des Chips um den porösen PC-Mikrokanal herum gedruckt. Erstellt in Kollaboration mit R. Pfister.²⁰⁹

Zunächst wurde die erfolgreiche Positionierung einer Hydrogelschicht mit eingekapselten Perizyten, gefolgt von einer mit eingekapselten Astrozyten, um den porösen PC-Mikrokanal des vasQchips durch den 3D-Biodruck überprüft. Dazu wurde das Zytosol der Perizyten zunächst mit dem Farbstoff CellTracker Geen CMFDA gefärbt und die Zellen anschließend in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml in der 5%igen Photopolymerlösung (GelMA-V2 *medium*, mit 0,3 % LAP) resuspendiert und in eine Druckerkartusche überführt. Das Zytosol der Astrozyten

wurde mit dem Farbstoff CellTracker Red CMTPIX gefärbt; anschließend wurden diese ebenfalls in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml in der Photopolymerlösung resuspendiert und in eine Druckerkartusche überführt. Anschließend wurden die Kartuschen in den Extrusionsdruckkopf des Biodruckers 3D Discovery Gen1 (regenHU) mit angeschlossenen Kühlsystem eingesetzt und der extrusionsbasierte Druckprozess in einem schichtweisen Verfahren gestartet. Dabei wurde zunächst eine Schicht der Photopolymerlösung mit den eingekapselten Perizyten um den porösen Mikrokanal des vasQchips gedruckt und mit der Aushärtungslampe Osram Ultra Vitalux für 30 s zum Hydrogel vernetzt. Anschließend wurde die zweite Schicht mit den eingekapselten Astrozyten gedruckt und ebenfalls vernetzt. Daraufhin wurde die gedruckte Struktur mit Kulturmedium überschichtet und die Positionierung der beiden Zelltypen um den Mikrokanal mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica TCE SPE) und der Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: 500 μm) überprüft. Mit der Software Leica LasX wurde daraus ein 3D-Bild rekonstruiert. Die 3D-Rekonstruktionen sowie die Aufnahmen der gedruckten Struktur um den Mikrokanal des Chips sind in Abbildung 123 dargestellt.

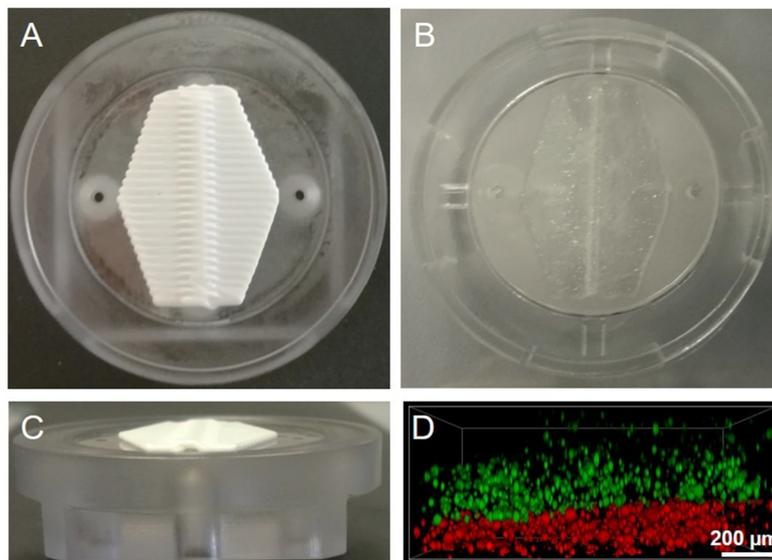


Abbildung 123: Fotografische und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der gedruckten Strukturen um den halbrunden porösen Mikrokanal des vasQchips. **A:** Gedruckte Struktur mit NIVEA Creme. **B:** Gedruckte Struktur mit dem Gelatine-basierten Hydrogel GelMA-V2. **C:** Seitliche Darstellung der gedruckten Struktur um den halbrunden Mikrokanal mit NIVEA Creme. **D:** Fluoreszenzmikroskopische 3D-Darstellung zwei gedruckter Hydrogelschichten um den Mikrokanal. Grün: in Biotinte eingekapselte und CellTracker Green CMFDA gefärbte Perizyten; rot: in Biotinte eingekapselte und mit CellTracker Red CMTPIX gefärbte Astrozyten. Erstellt in Kollaboration mit R. Pfister.²⁰⁹

Teilabbildung B zeigt die gedruckte Hydrogelstruktur mit den eingekapselten Perizyten und Astrozyten. Für eine bessere Visualisierung der Struktur wurde diese mit NIVEA Creme um den PC-Mikrokanal gedruckt und ist in Teilabbildung A dargestellt. Bei der Entwicklung des Druckprotokolls wurde darauf geachtet, dass die beiden Anschlüsse des unteren Kompartiments nicht mit einer Hydrogelschicht bedeckt wurden, da diese dadurch möglicherweise verstopfen könnten. Zusätzlich gewährte dies auch bei einem starken Quellen des Hydrogels

ausreichend Platz für eine Zugabe von Kulturmedium im unteren Kompartiment des Chips. In Teilabbildung C ist die gedruckte Struktur mit NIVEA Creme seitlich dargestellt. Teilabbildung D zeigt die erfolgreiche Positionierung der beiden verschiedenen Zelltypen um den Mikrokanal des vasQchips. Die schwarze halbrunde Struktur in der linken oberen Ecke zeigt den halbrunden PC-Mikrokanal. Um diesen ist eine Zellschicht mit den zuvor grün gefärbten Perizyten zu erkennen, gefolgt von einer Zellschicht mit den zuvor rot gefärbten Astrozyten. Ein Vermischen der beiden Zelltypen war nicht zu detektieren, sodass die erfolgreiche Positionierung der beiden Zelltypen um den Mikrokanal durch das extrusionsbasierte Druckverfahren bestätigt werden konnte.

Im nächsten Schritt wurde ein BBB-Modell mit hirnspezifischen Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten auf dem vasQchip aufgebaut. Da das Hirngewebe eine Festigkeit von 100 Pa bis 1000 Pa aufweist, wurden als Biotinten für den Druckprozess die beiden Gelatine-basierten Hydrogele GelMA-V2 *medium* und GelNB/GelS *medium* hinsichtlich ihrer Eignung für den Aufbau der BBB überprüft.^{288,289} Die rheologische Charakterisierung der beiden Gele ergab für die Speichermodul G' Werte von 320 Pa bis 400 Pa, womit diese im Bereich der Festigkeit des Hirngewebes lagen. Für den Aufbau der BBB wurde zunächst jeweils eine Schicht mit Perizyten, eingekapselt in 5 % GelMA-V2 *medium* oder in 5 % GelNB/GelS *medium*, und eine mit Astrozyten (eingekapselt in 5 % GelMA-V2 *medium* oder 5 % GelNB/GelS *medium*) im unteren Chipkompartiment um den porösen Mikrokanal gedruckt. Anschließend wurde der Mikrokanal mit Kollagen I beschichtet, der Chip mit einem Deckglas verschlossen, der Kanal mit den hirnspezifischen Endothelzellen ($7,5 \times 10^4$ Zellen/ml) besiedelt und der Chip an die Mikrofluidik angeschlossen. Die Kultivierung der Chips erfolgte über einen Zeitraum von 7 Tagen bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Flussgeschwindigkeit, mit der der Kanal mit Kulturmedium durchströmt wurde, betrug 100 µl/h. Zu den Zeitpunkten Tag 1 und Tag 7 wurde jeweils eine Lebend/Tot-Färbung der Perizyten und Astrozyten im unteren Kompartiment mit Calcein-AM (4 µM) und Propidiumiodid (0,02 mg/ml) durchgeführt und der Zellkern der hirnspezifischen Endothelzellen im Mikrokanal mit Hoechst 33342 (2 µg/ml) blau gefärbt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 124 dargestellt. Mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica TCE SPE) wurden Z-Stack Aufnahmen der Chips mit einer Höhe von 500 µm aufgezeichnet, anschließend mit der Software Leica LasX in 3D-Bilder rekonstruiert und eine zusätzliche Tiefenfärbung durchgeführt. Der Mikrokanal mit den Endothelzellen war auf den Bildern jeweils an der linken Seite zu erkennen.

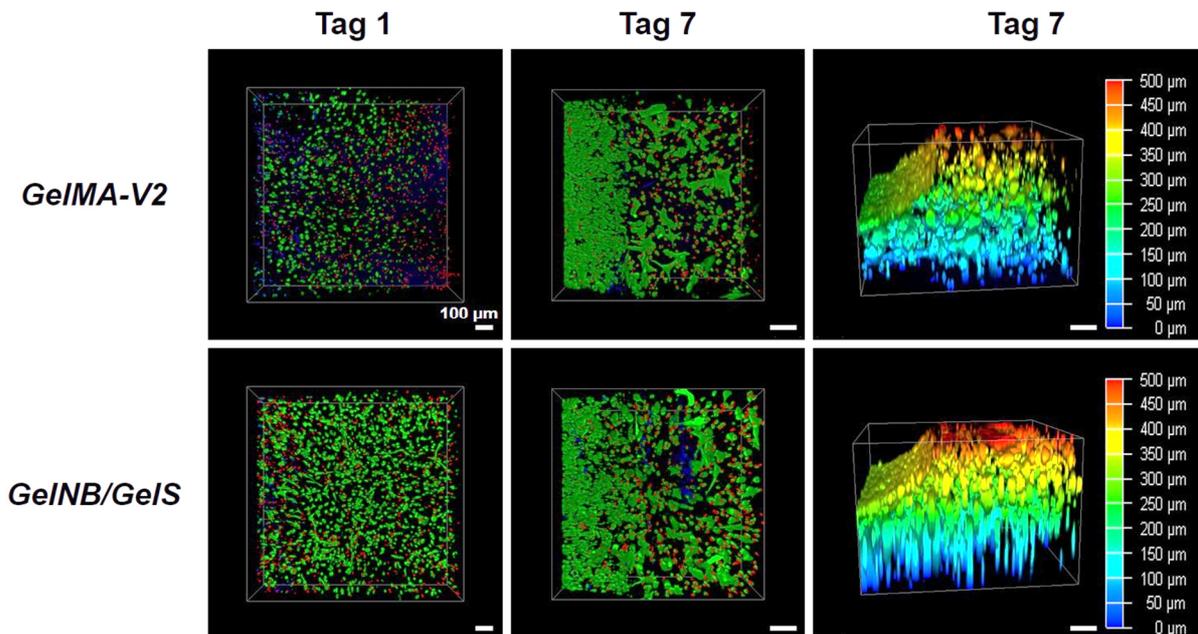


Abbildung 124: Co-Kultivierung und Lebend/Tot-Färbung der Perizyten und Astrozyten im vasQchip, eingekapselt in 5 % GelMA-V2 medium und GelNB/GelS medium. Die Lebend/Tot-Färbung mit 4 µM Calcein-AM (grün, $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 500\text{-}550 \text{ nm}$) und 0,02 mg/ml Propidiumiodid (rot, $\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 550\text{-}650 \text{ nm}$) wurde zu den Zeitpunkten Tag 1 und Tag 7 durchgeführt. Die Endothelzellen im Mikrokanal wurden mit Hoechst 33342 (2 µg/ml) blau gefärbt ($\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 410\text{-}500 \text{ nm}$). Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Tag 1: Zoom 1,0, Tag 7: Zoom 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: 500 µm, Schrittgröße 5 µm). Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Leica LasX-Software. Skalierung der Tiefenfärbung: 50 µm, blau: 0 µm, rot: 500 µm. Maßstab: 100 µm. Erstellt in Kollaboration mit R. Pfister.²⁰⁹

An Tag 1 waren für GelMA-V2 medium einige grüne und damit lebende Zellen im unteren Kompartiment detektierbar. Es waren jedoch auch, besonders am Rand der gedruckten Struktur, viele rote und damit tote Perizyten und Astrozyten zu erkennen. Diese könnten eventuell nicht ausreichend mit Nährmedium versorgt worden sein. Zusätzlich könnte sich auch der Druckprozess negativ auf die Viabilität der Perizyten und Astrozyten ausgewirkt haben. Die blauen Zellen auf der linken Seite des rekonstruierten 3D-Bildes stellten die mit Hoechst 33342 gefärbten Endothelzellen und somit den Mikrokanal des vasQchips dar. Die in GelMA-V2 medium eingekapselten Zellen wiesen zudem an Tag 1 eine runde, nicht ausgerichtete Zellmorphologie auf. Für GelNB/GelS medium waren an Tag 1 deutlich mehr grüne und damit lebende Perizyten und Astrozyten zu detektieren. Zusätzlich konnten bereits erste Veränderungen der Zellmorphologie erkannt werden. So waren innerhalb der gesamten Gelstruktur bereits erste elongierte und ausgerichtete Zellen zu erkennen. Nach einer Kultivierungsdauer von 7 Tagen waren sowohl im Chip mit GelMA-V2 als auch im Chip mit GelNB/GelS spindelförmige und ausgerichtete Zellen zu beobachten. Die sehr dichte grüne Zellschicht, die auf den beiden 3D-Bildern am linken Rand zu erkennen war, stellte die mit Calcein-AM gefärbten Endothelzellen im Mikrokanal dar. Obwohl die Färbelösung nur ins untere Kompartiment des Chips gegeben

wurde, diffundierte das Calcein-AM vermutlich durch den porösen Mikrokanal und färbte so die Endothelzellschicht grün. Um die gleichmäßige Verteilung der Zellen innerhalb der gedruckten Struktur im vasQchip zu überprüfen, wurde an Tag 7 zusätzlich eine Tiefenfärbung der 3D-Bilder mit der Software Leica LasX erstellt. Diese zeigte sowohl für GelMA-V2 *medium* als auch für GelNB/GelS *medium* eine gleichmäßige Verteilung der Perizyten und Astrozyten um den Mikrokanal. Dieser war als schwarze, halbrunde Struktur in der linken oberen Ecke der 3D-Bilder zu erkennen. Auch die kontinuierliche Auskleidung der hirnspezifischen Endothelzellen konnte anhand der dichten Zellschicht, die im Anschluss an den Kanal zu detektieren war, bestätigt werden.

Beim Vergleich beider Hydrogele konnten an Tag 1 nach dem Druckprozess im GelNB/GelS *medium*-Hydrogel mehr lebende Zellen detektiert werden als beim GelMA-V2 *medium*-Hydrogel. Somit könnte sich der Druckprozess des GelMA-V2-Photopolymers negativ auf die Viabilität der Zellen ausgewirkt haben. Da die Zellen über einen längeren Zeitraum bis zur Vernetzung in der Photopolymerlösung vorlagen, könnten die Methacrylamidgruppen des GelMA-Photopolymers durch Kreuzreaktionen mit Zellkomponenten die Viabilität der Zellen negativ beeinflusst haben. Da der Vernetzungsprozess bei GelMA zusätzlich auf einer radikalischen Kettenpolymerisation beruht, werden dabei vermehrt freie Radikale freigesetzt und deutlich höhere Mengen des Photoinitiators LAP müssen für eine erfolgreiche Vernetzung zugesetzt werden. Beides könnte sich ebenfalls negativ auf die Viabilität der eingekapselten Perizyten und Astrozyten ausgewirkt haben. Daraus lässt sich schließen, dass sich das GelNB/GelS *medium*-Hydrogel für den Aufbau eines BBB-Modells auf dem vasQchip aufgrund dessen erhöhten Biokompatibilität besser als das GelMA-V2 eignet. Dies könnte auf den milderen Bedingungen des Vernetzungsprozesses beruhen. Da dieser bei GelNB/GelS-Gelen über eine Stufenpolymerisation verläuft, werden weniger Radikale freigesetzt und deutlich geringere Mengen des Photoinitiators für eine erfolgreiche Vernetzung benötigt. Zudem waren in diesem Hydrogel bereits an Tag 1 spindelförmige Zellen zu erkennen. Die Perizyten und Astrozyten konnten dadurch schneller an die RGD-Domänen des Hydrogels adhären und sich innerhalb des Gels ausrichten. Somit konnte durch Kombination des 3D-Biodrucks mit dem Gelatine-basierten GelNB/GelS-Hydrogel und des *Organ-on-a-Chip*-Systems vasQchip mit angeschlossener Mikrofluidik ein Modell der BBB in einem *Proof-of-Principle*-Ansatz erfolgreich aufgebaut werden. Um dieses Modell noch präziser nachzubilden, wäre eine Kombination verschiedener Biodrucktechniken in Zukunft möglich. Die Perizyten könnten dabei mit Inkjet-basierten Drucktechniken in einer möglichst planaren Schicht um den porösen PC-Mikrokanal platziert werden. Durch einen anschließenden extrusionsbasierten Druckprozess von Astrozyten und Neuronen könnte ein vollständiges 3D-Hirnmodell aufgebaut werden.

4.6.5 Verwendung von GeINB/GelS als Matrix für die Herstellung von Knorpelgewebe

In Kollaboration mit Vadym Burchak, Leonard Siebler (AG Prof. Dr. Finkenzeller, Uniklinikum Freiburg) und Fritz Koch (IMTEK Freiburg) wurde das GeINB/GelS *high*-Hydrogel als Matrix für die Herstellung von Knorpelgewebe eingesetzt. Dazu wurde das Hydrogel am IMTEK Freiburg mit adipösen Stammzellen (ASCs) in eine Würfelstruktur verdrückt (1 x 1 cm) und anschließend in eine Maus implantiert. Für den Druckprozess wurde ein 3D-Drucker der Firma BioFluidix GmbH verwendet (siehe Abbildung 125 A). Nach vier Wochen wurden die gedruckten Strukturen am Uniklinikum Freiburg explantiert und im Vergleich zum Goldstandard Agarose charakterisiert. In Abbildung 125 B sind die Ergebnisse dargestellt. Bei Agarose konnte sowohl bei der gedruckten Struktur mit ASCs als auch bei der Struktur ohne ASCs eine starke Einwanderung von Blutgefäßen detektiert werden. Zusätzlich waren die Würfelstrukturen nach der vierwöchigen Inkubationszeit stark deformiert, es kam zu einer verstärkten Resorption des Materials in der Maus. Im Gegensatz dazu war beim GeINB/GelS-Hydrogel nach der Inkubationszeit keine Deformation der gedruckten Würfelstruktur zu erkennen, sodass bei diesem Material nur eine sehr geringe Resorption festgestellt werden konnte. Die leichte Rotfärbung der Konstrukte sowohl mit Stammzellen als auch ohne deutete ebenfalls auf eine Einwanderung von Blutgefäßen hin. Somit konnte durch den Druck von den GeINB/GelS-Hydrogelen mit den adipösen Stammzellen ein stabiles Knorpelgewebe rekonstruiert werden, welches auch nach einer vierwöchigen Implantation im Gegensatz zu Agarose als Matrixmaterial noch eine hohe Formstabilität aufwies. Somit erwiesen sich die schnell aushärtenden GeINB/GelS-Hydrogele als hervorragende, industriell prozessierbare Alternative zu herkömmlichen Biotinten.

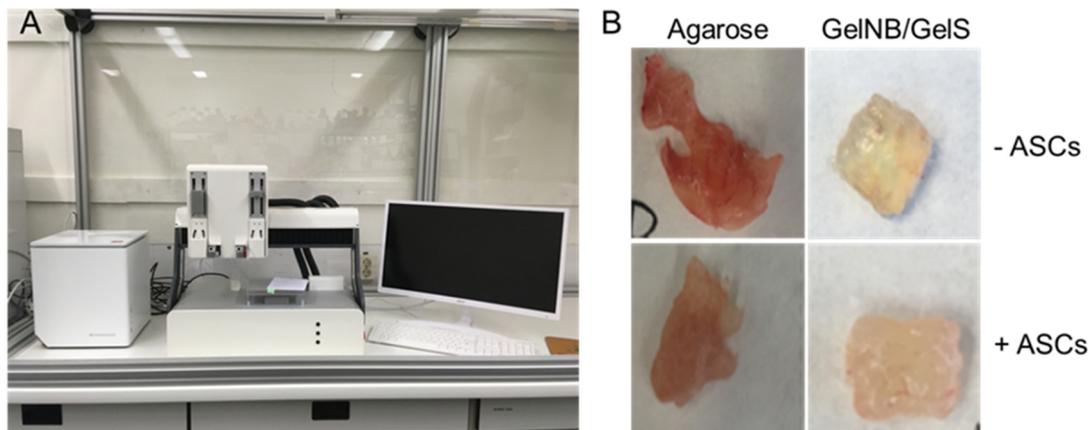


Abbildung 125: Generierung von Knorpelgewebe mit 3D-Biodrucktechniken für Langzeitstudien in der Maus. **A:** 3D-Drucker der Firma BioFluidix GmbH. **B:** Gedruckte Würfelstrukturen (1 x 1 cm) mit und ohne Stammzellen mit dem Goldstandard Agarose und dem neuartigen GeINB/GelS-Hydrogel als entsprechende Biotinten. Die Aufnahmen zeigen die Strukturen nach der Explantation aus der Maus. Erstellt in Kollaboration mit V. Burchak, L. Siebler (AG Prof. Dr. Finkenzeller, Uniklinikum Freiburg) und F. Koch (IMTEK, Freiburg).

5 Diskussion

Zur Generierung artifizierender Gewebemodelle durch 3D-Biodruckmethoden ist die Wahl einer geeigneten Biotinte von entscheidender Bedeutung. Diese muss sowohl während als auch im Anschluss an den Druckprozess als Stützmatrix für die eingebetteten Zellen fungieren und somit über geeignete mechanische und rheologische Eigenschaften verfügen, sodass die Formstabilität der gedruckten Strukturen auch über einen längeren Zeitraum gegeben ist.²⁹⁰ Zusätzlich sollte die Biotinte aber auch die natürlichen Funktionen der ECM *in vivo* widerspiegeln und den eingebetteten Zellen eine Proliferation, Migration, Differenzierung und Gewebekonstruktion erlauben.^{291,292} Viele Hydrogele erfüllen diese Anforderungen und eignen sich dadurch als Biotinten für den Aufbau von 3D-Gewebemodellen durch Biodruckverfahren.^{293,294} Dies gilt insbesondere für Gelatine-basierte Hydrogele.^{295,296} Da Gelatine aus dem Bindegewebsbaustein Kollagen gewonnen wird, besitzt Gelatine viele ECM-ähnliche Eigenschaften, wie die essentiellen Zellinteraktionsdomänen.¹⁸⁵ Zusätzlich ist sie durch die intrinsischen Protease-Schnittstellen bioabbaubar und biokompatibel. Da Gelatine als Reinstoff unter Zellkulturbedingungen bei 37 °C jedoch keine Formstabilität aufweist und sich bei diesen Temperaturen verflüssigt, ist sie für eine Anwendung in der 3D-Zellkultur nicht geeignet.¹²⁸ Durch eine chemische Modifikation der Gelatineketten kann diese jedoch zu verschiedenen Photopolymeren funktionalisiert werden, die durch eine lichtinduzierte Photoreaktion ein kovalent-verknüpftes und temperaturstabiles Hydrogelnetzwerk ausbilden.²⁹⁷

Ein besonders weit verbreitetes Photopolymer der Gelatine ist GelMA und wurde bereits von vielen Wissenschaftlern für den Aufbau von Gewebemodellen eingesetzt.²⁹⁸⁻³⁰⁰ GelMA wurde deshalb im Rahmen des Projekts zunächst nach dem Protokoll von Van den Bulcke *et al.* synthetisiert.¹¹² Die Aminogruppen der Lysinseitenketten wurden dabei mit Methacrylsäure zum Photopolymer GelMA umgesetzt. Eine Charakterisierung der synthetisierten Photopolymere zeigte jedoch, dass die drei synthetisierten Varianten *low*, *medium* und *high* mit ihren entsprechenden Funktionalisierungsgraden von 68 % bis 90 % sehr nahe beieinanderlagen. Um ein noch breiteres Anwendungsspektrum der GelMA-Photopolymere zu gewährleisten, wurde die Synthese in einem nächsten Schritt an die in der verwendeten Gelatine (Typ A, Bloom 300, Schweinehaut) vorhandenen freien Aminogruppen (0,266 mmol/g Gelatine) angepasst. Dadurch wurden drei neue Photopolymere erhalten: GelMA-V2 *low* mit einem Funktionalisierungsgrad von 36 %, GelMA-V2 *medium* mit 58 % und GelMA-V2 *high* mit 71 %. Durch die unterschiedlichen Funktionalisierungsgrade konnten später Hydrogele mit unterschiedlichen Vernetzungsgraden und damit unterschiedlichen Festigkeiten ausgebildet werden. Somit könnten durch Einsatz der verschiedenen Photopolymervarianten *low*, *medium* und *high* sowohl weiches Gewebe wie Leber oder Niere als auch festes Knochen- und Knorpelgewebe zukünftig nachgebildet werden. Da die lichtinduzierte Vernetzung der GelMA-Photopolymere zum Hydrogel über einen radikalischen Kettenmechanismus erfolgt, wird bei der Reaktion jedoch eine große Anzahl freier Radikale gebildet, die sich negativ auf die Viabilität der Zellen

auswirken können.²⁰⁰ Aus diesem Grund wurde als weiteres Gelatine-basiertes Photopolymer GelNB synthetisiert, bei dem Gelatine mit einer Norbornengruppe funktionalisiert wird. Dieses kann dann durch eine Thiol-En Reaktion mit einer Thiolgruppe zum Hydrogel vernetzt werden. Da diese Reaktion über einen radikalischen Stufenwachstumsprozess abläuft, werden weniger Radikale freigesetzt, was sich positiv auf die Viabilität der eingebetteten Zellen auswirkt.³⁰¹ Für die Synthese des Photopolymers GelNB wurde auf klassische Methoden der Peptidchemie zurückgegriffen. Durch EDC-HCl und NHS wurde die Carboxylgruppe der Norbornencarboxylsäure aktiviert und anschließend mit Gelatine zum GelNB-Polymer umgesetzt. Durch eine Anpassung der Norbornenmengen an die freien Aminogruppen der Gelatine wurden drei unterschiedlich funktionalisierte Varianten des Polymers erhalten (*low*, *medium* und *high*). Dieser Syntheseansatz erwies sich als sehr effektiv, da damit das komplette Spektrum an Funktionalisierungsgraden abgedeckt werden konnte. So wies *low* einen Funktionalisierungsgrad von 21 %, *medium* einen von 53 % und *high* einen von 97 % auf. Diese vielversprechende, auf der klassischen Peptidchemie basierende Synthesestrategie wurde auch von Tytgat *et al.* erst vor kurzem veröffentlicht.²⁰² Jedoch wurde dabei als Lösungsmittel für die Reaktion DMSO verwendet, sowie Aceton zur Gewinnung des Rohprodukts. Diese müssen dann durch einen aufwendigen Aufreinigungsprozess aufgrund zytotoxischer Effekte gründlich entfernt werden.^{203,302,303} Bei dem im Rahmen dieses Projekts gewählten Syntheseweg wurde das Photopolymer GelNB lösungsmittelfrei in einer wässrigen Umgebung synthetisiert. Dadurch kann dieses direkt für die Zellkultur eingesetzt werden, da keine organischen Lösungsmittelrückstände im Produkt zurückbleiben können. Um aus dem Photopolymer GelNB ein vernetztes Hydrogel zu bilden, wurde als Gegenspieler eine Thiolgruppe benötigt. Diese kann z.B. durch einen zusätzlichen Crosslinker wie DTT zur Verfügung gestellt werden. Eine weitere Möglichkeit stellte die Funktionalisierung von Gelatine mit einem Thiolacton dar, wodurch das Photopolymer GelS erhalten wurde. Durch eine Kombination der beiden Photopolymere GelNB und GelS bei der Hydrogelbildung durch die Thiol-En Reaktion konnte auf den Einsatz eines Crosslinkers verzichtet werden. Die Synthese von GelS erfolgte nach einem bereits etablierten Syntheseprotokoll von Van Vlierberghe *et al.*²⁰⁷ Durch eine Anpassung der Thiolactonmengen an die freien Aminogruppen der Gelatine konnten zwei verschiedene GelS-Varianten synthetisiert werden. GelS *low* wies dabei einen Funktionalisierungsgrad von 20 % und GelS *medium* einen von 50 % auf. Höhere Funktionalisierungsgrade konnten selbst bei einer Erhöhung der zugegebenen Thiolactonmengen mit diesem Syntheseweg nicht erreicht werden. Für die Ausbildung der Gelatine-basierten Hydrogele musste zu den jeweiligen Photopolymeren ein Photoinitiator zugesetzt werden, der die Polymerisation der einzelnen Polymerketten miteinander nach Bestrahlung initiierte. Bei GelMA verlief die Vernetzung nach Initiation über eine radikalische Kettenpolymerisation, bei GelNB/DTT und GelNB/GelS über die Thiol-En Reaktion mit einem radikalischen Stufenwachstumsprozess. Dabei lag ein weiterer Vorteil der Hydrogelbildung durch die Thiol-En Reaktion in der Ausbildung homogener Polymernetzwerke. Da sich die beiden funktionellen Gruppen bei den GelNB/GelS-Hydrogelen und den

GelNB/DTT-Hydrogelen auf zwei unterschiedlichen Polymersträngen bzw. auf einem Crosslinker befanden, wurden bei der Reaktion immer zwei verschiedene Stränge miteinander vernetzt. Bei den GelMA-Hydrogelen war dies nicht der Fall. Da auch die Vinylgruppen desselben Gelatinestranges miteinander reagieren konnten, könnte dies zu einer unvollständigen Vernetzung des Hydrogels führen.^{224,225}

Auch ein Vergleich der Polymerisationszeiten bis zur sichtbaren Vernetzung der verschiedenen Gelatine-basierten Hydrogele zeigte einen weiteren Vorteil der Thiol-En Reaktion auf. So konnte für GelNB/DTT als auch für GelNB/GelS die Menge an benötigtem Photoinitiator für eine erfolgreiche Vernetzung der Polymere von 0,3 % auf 0,03 % reduziert werden, ohne dass die Polymerisationszeit dabei zunahm. Diese lag für die GelNB/GelS *high*-Gele für die Vernetzung eines 2 mm hohen Gels sowohl bei 0,3 % als auch bei 0,03 % bei 2 s. Bei den GelMA-Hydrogelen resultierte die Reduktion der Photoinitiatormenge in einer starken Zunahme der Polymerisationszeit bis zur sichtbaren Aushärtung. Dieser Effekt konnte auch von Fedorovich *et al.* beobachtet werden und kann sich auch auf die mechanischen Eigenschaften der GelMA Gele auswirken.³⁰⁴ Durch die Reduktion der Photoinitiatormenge konnte die Bildung der GelNB/DTT- und GelNB/GelS-Hydrogele unter zellfreundlicheren Bedingungen ablaufen. Wie die Zytotoxizitätsuntersuchung des Photoinitiators LAP auf Leberkrebszellen und Endothelzellen zeigte, wirkte dieser bereits ab Konzentrationen von 0,1 % stark zytotoxisch, sodass mit möglichst geringen Mengen in Gegenwart von Zellen gearbeitet werden sollte. Aber auch der für die GelNB/DTT-Hydrogele verwendete Crosslinker DTT wies in den Untersuchungen zur Zytotoxizität bereits ab einer Konzentration von 1 mM und einer Inkubationsdauer von 3 h starke toxische Effekte auf, sodass die Viabilität der Leberkrebszellen bei unter 50 % lag. Dies zeigte nochmals einen weiteren Vorteil des GelNB/GelS-Hydrogels auf, da bei diesem auf den Einsatz eines potentiell toxischen Crosslinkers verzichtet werden konnte.

Die Evaluierung des Quellverhaltens der verschiedenen Hydrogele war für den Einsatz der Materialien im *Tissue Engineering* von besonderem Interesse. Da verschiedene Gewebetypen unterschiedliche Flüssigkeitsgehalte *in vivo* aufweisen, sollten die Hydrogele für die artifiziale Gewebebildung ein ähnliches Quellverhalten besitzen. Zusätzlich beeinflussen die Quelleigenschaften auch den Stofftransport innerhalb des Hydrogels. Die Resultate zeigten, dass alle Hydrogele bereits nach 24 h Flüssigkeitsgehalte aufwiesen, die sich mit dem Flüssigkeitsgehalt von Gelatine-Gelen deckten. Zudem konnte eine Abhängigkeit der Flüssigkeitsaufnahme vom Vernetzungsgrad der Hydrogele und damit vom Funktionalisierungsgrad der Photopolymere GelMA, GelNB und GelS festgestellt werden. Je geringer der Vernetzungsgrad, desto größer waren die gebildeten Poren innerhalb des Hydrogels und desto mehr Flüssigkeit konnte sich einlagern. Das größte Quellverhältnis wies dabei das GelNB/GelS *low*-Hydrogel auf, welches um das 17-fache seines Startpolymergewichts gequollen war und damit mehr Flüssigkeit als das unfunktionalisierte Gelatine-Hydrogel binden konnte. Durch die Variation des Funktionalisierungsgrades während der Synthese und die dadurch entstehenden, unterschiedlich dicht vernetzten Polymernetzwerke konnte gezeigt werden, dass sich die Quelleigenschaften

unterschiedlich beeinflussen lassen und sich die verschiedenen Hydrogelvarianten *low*, *medium* und *high* somit zum Aufbau von verschiedenen artifiziellen Gewebetypen eignen. Der gleiche Effekt war auch bei der enzymatischen Degradation der vernetzten Hydrogele zu beobachten. Die Hydrogele GelMA *low*, GelNB/DTT *low* und GelNB/GelS *low* wurden am schnellsten abgebaut, da die Polymernetzwerke nur gering miteinander verknüpft waren. Die *medium*- und *high*-Varianten der Hydrogele waren deutlich stabiler, da die einzelnen Polymerketten dieser Gele über mehr kovalente Bindungen miteinander vernetzt waren. Dadurch zeigte sich, dass sich auch die Degradationseigenschaften der Hydrogele über den Funktionalisierungsgrad der Photopolymere GelMA, GelNB und GelS beeinflussen ließen. Bei der rheologischen Charakterisierung der nicht-vernetzten Photopolymerlösungen GelMA-V1, GelMA-V2, GelNB/DTT und GelNB/GelS konnte eine wichtige Eigenschaft der Lösungen für einen späteren Extrusionsdruckprozess detektiert werden.^{245,305} Alle Lösungen wiesen bei niedrigen Temperaturen ein scherverdünnendes Verhalten auf. Dieses war auf die Selbstassemblierung der Kollagen-Tripelhelices zurückzuführen. Bei niedrigen Temperaturen lagern sich diese zusammen und bilden ein festes, physikalisch vernetztes Gel. Diese Assemblierung ist ein physikalischer Prozess und dadurch reversibel.³⁰⁶ Nimmt die Scherrate und damit die Kraftereinwirkung zu, lösen sich die Tripelhelices voneinander und verflüssigen die Polymerlösungen wieder. Dieser Effekt kann bei extrusionsbasierten Biodruckverfahren genutzt werden, da sich die gelierten Polymere bei höheren Scherraten, die z.B. in Nadelöffnungen vorliegen, verflüssigen. Sinkt die Scherrate, so bilden sich die Helices wieder aus und sorgen in gedruckten Konstrukten bis zur chemischen Vernetzung durch Licht für Formstabilität. Eine Analyse der Speichermodule der Photopolymere bei 14 °C zeigte, dass sich die Funktionalisierung der Gelatine mit funktionellen Gruppen auf die Ausbildung der Tripelhelices und damit die Festigkeit der resultierenden physikalisch vernetzten Gele auswirkte. Auch Van den Bulcke *et al.* und Zhu *et al.* konnten diesen Effekt bereits feststellen.^{89,112} Bei GelMA-V1 und GelMA-V2 konnten ähnliche Werte wie bei den unfunktionalisierten Gelatine-Gele festgestellt werden. Bei GelNB/DTT und GelNB/GelS lagen die Werte der Speichermodule deutlich unter den Werten der Gelatine-Gele. Die Norbornen- und Thiolgruppe der funktionalisierten Photopolymere verhinderten zum Teil die Zusammenlagerung der Kollagenhelices durch sterische Effekte. Zusätzlich konnte bei den GelNB/GelS-Varianten *low*, *medium* und *high* eine Abhängigkeit des Speichermoduls vom Funktionalisierungsgrad beobachtet werden. Je weniger Norbornen- und Thiolgruppen vorhanden waren, desto geringer war der Einfluss auf die Tripelhelices-Bildung und desto größer das Speichermodul des resultierenden physikalisch vernetzten Hydrogel. Die rheologische Charakterisierung der photopolymerisierten Hydrogele zeigte eine Abhängigkeit des Speichermoduls und damit der Festigkeit der Hydrogele vom Vernetzungsgrad auf. Besonders deutlich konnte dies bei den GelMA-V2-Hydrogelen und den GelNB/GelS-Hydrogelen beobachtet werden. Je geringer der Vernetzungsgrad des Hydrogels und der Funktionalisierungsgrad der Photopolymere waren, desto geringer war das Speichermodul. Somit wiesen die *low*-Varianten der Hydrogele die geringsten Festigkeiten und die *high*-Hydrogele die größten Festigkeiten auf. Zusätzlich konnte auch ein Einfluss eingekapselter Zellen auf die

Festigkeit der Hydrogele GelMA-V2, GelNB/DTT und GelNB/GelS festgestellt werden. So nahm die Festigkeit der Hydrogele bei einer Netzwerkbildung der eingekapselten Zellen im Vergleich zu Gelen, in denen die Zellen eine runde Morphologie aufwiesen und kein interzelluläres Netzwerk bildeten, deutlich zu. Somit bewirkte die Netzwerkbildung der Zellen eine zusätzliche Stabilisierung des Hydrogels.

Die Biokompatibilität der verschiedenen Hydrogele wurde anhand eingebetteter Leberkrebszellen, primärer Hautfibroblasten und primärer Endothelzellen über einen Zeitraum von 21 Tagen durch eine Lebend/Tot-Färbung untersucht. Alle untersuchten GelMA-V1-, GelMA-V2-, GelNB/DTT- und GelNB/GelS-Hydrogele erwiesen sich dabei für die drei Zelltypen als biokompatibel. Die Viabilitäten lagen bei 60-90 %. Die abfallenden Viabilitäten, die besonders an Tag 21 festgestellt werden konnten, waren auf das Auflösen der Hydrogele und damit das Herauslösen der Zellen aus der Gelstruktur zurückzuführen. Bei den Fibroblasten war in allen untersuchten Hydrogelen eine Netzwerkbildung der einzelnen Zellen untereinander zu erkennen. Besonders bei den *low*-Varianten der Hydrogele konnten erste Zellausläufer bereits an Tag 1 beobachtet werden. Die schnellste Netzwerkbildung der NHDF war in den GelNB/GelS *low*-Gelen zu erkennen. Bereits nach einer Kultivierungszeit von 7 Tagen bildeten die NHDF ein dicht verknüpftes interzelluläres Netzwerk in allen Gelebenen aus. Das GelNB/GelS-Hydrogel begünstigte somit die Zelladhäsion und Elongation der Fibroblasten. Bei den Endothelzellen war dagegen keine Netzwerkbildung und Ausrichtung der Zellen detektierbar. Über den gesamten Kultivierungszeitraum wiesen die HUVEC eine runde Zellmorphologie auf. Im Hydrogel GelMA konnte von Monteiro *et al.* und Liu *et al.* jedoch eine vaskuläre Netzwerkbildung von eingekapselten HUVEC Zellen bereits festgestellt werden.^{263,307} Diese lagen jedoch nicht einzeln, sondern mit einem weiteren Zelltyp gemischt als Kokultur vor. Zusätzlich konnte von Monteiro *et al.* festgestellt werden, dass eine stabile Netzwerkbildung nur bei hohen Zellkonzentrationen von 10×10^6 Zellen/ml stattfand.²⁶³ Die Evaluierung des Proliferationsverhaltens der eingebetteten Leberkrebszellen und Fibroblasten bestätigte für beide Zelltypen eine Zunahme der Zellzahl in allen untersuchten Hydrogelen. Für die Leberkrebszellen konnte die größte Zunahme der Zellzahl bei den jeweiligen *low*-Varianten der Hydrogele festgestellt werden. Durch den geringeren Vernetzungsgrad dieser Varianten waren die Poren innerhalb der Hydrogele größer, wodurch die Zellen für eine Migration und Proliferation mehr Platz hatten. Auch eine zusätzliche Remodellierung der Gelstruktur durch enzymatischen Abbau der Zellen würde in den *low* Gelen deutlich schneller als in den dicht vernetzten *medium*- und *high*-Varianten ablaufen. Dieser Effekt war für die eingekapselten NHDF auch bei den GelNB/GelS-Gelen zu detektieren. Auch hier war die Zunahme der Zellzahl bei der *low*-Variante am größten. In Kooperation mit Vadym Burchak (AG Prof. Dr. Finkenzeller, Universitätsklinikum Freiburg) wurde die Biokompatibilität der neuartigen GelNB/GelS-Hydrogele anhand eingekapselter mesenchymaler Stammzellen überprüft. Eine Evaluierung durch eine Lebend/Tot-Färbung nach einer zweitägigen Kultivierungsdauer zeigte einen hohen Anteil lebender Stammzellen auf. Die Viabilität der ASC lag für alle drei GelNB/GelS-Varianten *low*, *medium* und *high* zwischen 75 % und 81 %, wobei die Viabilität der eingekapselten Zellen in den *low*-Gelen mit

81 % den höchsten Wert aufwies. Damit ähnelten die Werte den von Wehrle *et al.* ermittelten Viabilitätswerten der ASC in verschiedenen natürlichen Hydrogelen wie Fibrin, Gelatine oder der Mischung aus Fibrin, Gelatine, Hyaluronsäure und Glycerol.³⁰⁸ Somit konnte in einem ersten Versuch auch eine Eignung der GelNB/GelS-Hydrogele für die 3D-Kultivierung von adipösen mesenchymalen Stammzellen und ein möglicher Einsatz der Gele für die Rekonstruktion von Knochen- und Knorpelgewebe aufgezeigt werden.

Für die Optimierung des 3D-Druckprozesses erwies sich die Verwendung am 3D-Drucker integrierten Kühlsystems als erfolgreich. Dadurch konnte eine geeignete Viskosität der verschiedenen Gelatine-basierten Photopolymere für den extrusionsbasierten Druck erzielt werden. Der temperaturabhängige Druckprozess wurde dabei durch die thermoreversible Gelierung der Gelatine durch die Selbstassemblierung der Kollagen-Tripelhelices ermöglicht. Für alle Photopolymerlösungen wurde dabei ein ähnliches Verhalten detektiert. War die gewählte Temperatur zu hoch, war die Lösung in der Kartusche zu einem festen Gel ausgegärt; ein Druck von homogenen Strukturen war nicht möglich. Bei zu hohen Temperaturen war die Polymerlösung zu flüssig und die gedruckten Strukturen wiesen keine Formstabilität mehr auf. Die Temperatur musste für jede Photopolymerlösung so eingestellt werden, dass die thermoreversible Zusammenlagerung der Kollagen-Tripelhelices zu einem gewissen Grad möglich war, sodass die Viskosität der Photopolymerlösung erhöht wurde und formstabile Konstrukte gedruckt werden konnten, die anschließend durch eine lichtinduzierte Polymerisation stabil vernetzt wurden. Gleichzeitig musste die Lösung flüssig genug sein, um einen Druck homogener Strukturen zu ermöglichen. Für die Photopolymerlösungen GelMA-V1, GelMA-V2 und GelNB/GelS lag die am besten geeignete Drucktemperatur bei 24 °C, für die GelNB/DTT-Lösung bei 16 °C. Dies wurde auf den sterischen Einfluss der Norbornengruppe zurückgeführt. Durch ihre Größe könnte diese die Bildung der Tripelhelices sterisch erschweren, wodurch ein Gelierungsprozess erst bei deutlich geringeren Temperaturen ablaufen würde. Um eine geeignete Viskosität der Biotinten zu erzielen, muss normalerweise mit hohen Polymerkonzentrationen gearbeitet werden. Durch den temperaturabhängigen Druckprozess können die Polymere in deutlich geringeren Konzentrationen eingesetzt werden. So wurde GelMA bereits in Konzentrationen von unter 5 % erfolgreich mit der temperaturabhängigen Druckmethode gedruckt.^{245,309} Um eine geeignete Viskosität der Biotinten für Extrusionsdruckprozesse zu erzielen, können neben der Temperaturanpassung auch noch weitere Methoden verwendet werden. Bei Biotinten, die sich durch Photopolymerisationsreaktionen vernetzen lassen, können die Tinten während des Druckprozesses in einer lichtdurchlässigen Nadel *in situ* vernetzt werden. Dies wurde von Ouyang *et al.* bereits erfolgreich für den Druck von GelMA und von Gallarraga *et al.* erfolgreich zum Druck von Norbornen-modifizierter Hyaluronsäure eingesetzt.^{310,311}

Die Evaluierung des kritischen Scherstress für Zellen bei einem Druck in newtonschen Flüssigkeiten zeigte, dass bei den für die Gelatine-basierten Biotinten erforderlichen Extrusionsdrücken der resultierende Scherstress so gering war, dass kein Einfluss auf die Viabilität der

Zellen detektiert werden konnte. Von Blaeser *et al.* konnte ebenfalls ein Einfluss des Scherstress auf die Viabilität von mesenchymalen Stammzellen erst ab Werten von über 10 kPa festgestellt werden.³¹² Bei Vergleich der Nadelgeometrien konnte ein höherer resultierender Scherstress für die konische Nadel als für die zylindrische festgestellt werden. Trotzdem wurde für die Druckversuche mit zellbeladenen Biotinten die konische Nadel eingesetzt, um Verstopfungen zu vermeiden. Die Untersuchung des auf die Zellen wirkenden Scherstress deutete zusätzlich an, dass die Größe der Zelle einen erheblichen Einfluss spielt. So konnte ein signifikanter Abfall der Viabilität lediglich bei den großen NHDF beobachtet werden, wohingegen die kleineren HepG2 Zellen und HUVEC bei demselben Scherstress keinen Viabilitätsabfall zeigten.

Die Evaluierung der Eignung der verschiedenen Gelatine-basierten Hydrogele als Biotinten wurde anhand des Druckes der zellbeladenen Photopolymerlösungen untersucht. Dabei war die Eignung des neuartigen GelNB/GelS-Hydrogels von besonderem Interesse, da von Tytgat *et al.* bereits erfolgreich Strukturen mit diesem Hydrogel gedruckt werden konnten, die Zellen aber erst im Anschluss auf die vernetzte Struktur ausgesät wurden.²⁰² Werden die Zellen jedoch in der Biotinte resuspendiert und gemeinsam mit dieser in definierte Strukturen gedruckt, sind sie einer Vielzahl von potentiell schädlichen Prozessen und Komponenten wie Crosslinkern, den Photoinitiatoren, dem Extrusionsdruckprozess und der lichtinduzierten Vernetzung ausgesetzt. Daher wurde die Viabilität der eingekapselten NHDF direkt im Anschluss an den Druckprozess sowie zu späteren Zeitpunkten (Tag 7 und Tag 14) überprüft. Dabei konnte nur bei GelMA ein negativer Einfluss des Druckprozesses auf die Viabilität der NHDF festgestellt werden. Ein möglicher Grund dafür könnte die Kreuzreaktion der Methacrylamidgruppe mit Zellkomponenten darstellen, weshalb dieser Effekt auch verstärkt bei dem hochfunktionalisierten GelMA *high* auftrat. Hier lag die Viabilität der eingekapselten NHDF lediglich bei 53 %. Zusätzlich verlief der Vernetzungsprozess über eine radikalische Kettenpolymerisation, bei der vermehrt Radikale freigesetzt werden und auch eine größere Menge des Photoinitiators zugesetzt werden musste. Beides könnte auch einen negativen Einfluss auf die Viabilität der NHDF ausgeübt haben. Im Vergleich zu GelMA lagen die Viabilitäten der NHDF in den GelNB/DTT- und GelNB/GelS-Gelen direkt im Anschluss an den Druckprozess sowie nach einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen bei über 80 % und die untersuchten Hydrogele erwiesen sich somit als geeignete Biotinten für den Druck von Zellen. Für alle Hydrogele konnte eine Veränderung der Morphologie der NHDF beobachtet werden. Bereits nach sieben Tagen bildete sich in allen Gelen ein interzelluläres Netzwerk aus, was sich nach einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen nochmals verstärkte. Besonders interessant war die Tatsache, dass sich die Zellen vermehrt an der longitudinalen Achse der gedruckten Strukturen ausrichteten. Dies lässt vermuten, dass die Geometrie der gedruckten Struktur einen Einfluss auf die Ausrichtung der Zellen ausübte. Ein Einfluss des Vernetzungsgrads der Hydrogelvarianten *low*, *medium* und *high* auf die Morphologie der NHDF konnte für alle drei Gelatine-basierten Hydrogele im Gegensatz zu den Biokompatibilitätsuntersuchungen von Gelen, bei denen die Zellen lediglich eingebettet wurden, nicht festgestellt werden.

In Kooperation mit Vadym Burchak, Leonard Siebler (AG Prof. Dr. Finkenzeller, Uniklinikum Freiburg) und Fritz Koch (IMTEK, Freiburg) konnte das neuartige GelNB/GelS-Hydrogel als Matrix zum Aufbau von Knorpelgewebe mit adipösen Stammzellen eingesetzt werden. Nach einer vierwöchigen Langzeitstudie der gedruckten Würfelstruktur in der Maus konnte bei den GelNB/GelS-Gelen keine Deformation und nur eine geringe Resorption festgestellt werden, wohingegen die Agarose-Gele stark deformiert waren. Somit erwies sich das GelNB/GelS-Hydrogel zum Aufbau von Knorpelgewebe als formstabilere, bessere Alternative im Vergleich zum Goldstandard Agarose.

Auch ein erfolgreicher Aufbau eines Blut-Hirnschranke-Modells auf dem im Arbeitskreis etablierten *Organ-on-a-Chip*-System vasQchip war mit den Gelatine-basierten Biotinten und dem temperaturabhängigen Extrusionsdruckprozess möglich. Zunächst erfolgte eine Überprüfung der erstellten Druckprotokolle mit zwei verschiedenen gefärbten Zelltypen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Zellen erfolgreich um den PC-Mikrokanal platziert wurden; ein Vermischen der einzelnen Schichten und damit der Zelltypen war nicht zu detektieren. Für den Aufbau des BBB-Modells wurden die beiden Hydrogele GelMA-V2 *medium* und GelNB/GelS *medium* verwendet und miteinander verglichen. Das GelNB/GelS-Hydrogel erwies sich dabei als geeigneter, da in dem GelMA-Gel nach dem Druckprozess eine erhöhte Anzahl toter Zellen festgestellt wurde. Im GelNB/GelS-Hydrogel konnten jedoch an Tag 1 bereits erste ausgerichtete Perizyten und Astrozyten beobachtet werden, deren Anzahl sich bis zu Tag 7 weiter erhöhte. Somit konnte in einem ersten *Proof-of-Principle* Versuch ein Modell der BBB bestehend aus Perizyten, Astrozyten und hirnspezifischen Endothelzellen, mit welchen der Mikrokanal ausgekleidet wurde, durch das extrusionsbasierte Druckverfahren und den Einsatz der Gelatine-basierten Biotinten generiert werden. Das GelNB/GelS-Hydrogel, welches durch die Thiol-En Reaktion vernetzt wird, erwies sich dabei als eine vielversprechende Biotinte für zukünftige Anwendungen im Bereich des *Tissue Engineering* und des 3D-Biodrucks zum Aufbau von *in vitro* Gewebemodellen.

Um das Modell in Zukunft noch präziser zu gestalten, könnte eine Kombination verschiedener Drucktechniken angewendet werden. Die Perizyten könnten durch ein Inkjet-basiertes Druckverfahren in einer planaren Schicht um den PC-Mikrokanal positioniert werden. Durch einen anschließenden Druckprozess von Biotinten mit Astrozyten und Neuronen könnte dann ein vollständiges 3D-Hirnmodell aufgebaut werden. Dass die Kombination des 3D-Biodrucks mit der *Organ-on-a-Chip*-Technologie eine vielversprechende Methode ist, um artifizielle Gewebemodell noch exakter nachzubilden, wird auch an den zahlreichen Publikationen in diesem Bereich deutlich. So konnten Chang *et al.* ein 3D-Lebermodell auf einem Chip-System aufbauen, was als *in vitro* Modell für den Wirkstoffmetabolismus diente.³¹³ Auch Modelle der Niere und des Nervensystems wurden so bereits erfolgreich generiert.^{314,315} Eine weitere Möglichkeit, Gewebemodelle auf den Chip-Systemen aufzubauen, ist durch einen einstufigen Fabrikationsprozess, bei dem sowohl die mechanischen Komponenten des Chips als auch die Zellen in einem Schritt zusammen verdrückt werden.³¹⁶ Lee *et al.* konnten durch den gleichzeitigen Einsatz verschiedener Extrusionsdruckköpfe in nur einem Druckvorgang ein komplettes

Liver-on-a-Chip-Modell aufbauen.³¹⁷ Ein weiterer verbreiteter Ansatz ist der 3D-Biodruck von Strukturen mit integrierten Mikrokanälen. Diese können entweder durch den Druck tubulärer Strukturen, oder durch den indirekten Druck eines Kanalnetzwerks innerhalb der Struktur erzeugt werden. Dabei kommt eine sogenannte Opfertinte zum Einsatz, mit der die Kanalstrukturen generiert werden. Die Opfertinte wird später durch verschiedene Techniken entfernt, wodurch ein hohles Kanalnetzwerk in den gedruckten Konstrukten entsteht. Wu *et al.* nutzen Pluronic F127 als Opfertinte, die sich bei kalten Temperaturen verflüssigt, und generierten so ein Kanalnetzwerk in einer Hydrogelstruktur.³¹⁸ Auch Agarose oder Gelatine wurden bereits erfolgreich als Opfermaterialien zur Generierung von Kanalnetzwerken eingesetzt.^{319,320} Die Kombination des 3D-Biodrucks mit mikrofluidischen *Organ-on-a-Chip*-Technologien zusammen mit neuen Entwicklungen im Bereich der Biotinten können in Zukunft die Generierung einer biomimetischen Mikroumgebung mit einer heterogenen 3D-Struktur ermöglichen und kann genutzt werden, um exakte Gewebemodelle für eine Anwendung in der regenerativen Medizin oder der Medikamentenentwicklung herzustellen.³²¹ Die in dieser Arbeit hergestellte ultra-schnell aushärtende Biotinte GeINB/GeIS könnte hierbei als hervorragende, industriell prozessierbare Alternative zu herkömmlichen Biotinten ein breites Anwendungsgebiet gewährleisten.

6 Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Verwendete Zelllinien/ Primärzellen

HepG2 - humane Leberkrebszelllinie

NHDF - primäre normale humane dermale Fibroblasten

HUVEC - Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene

ASC – Adipöse mesenchymale Stammzellen

hCMEC/D3 – humane cerebrale Endothelzellen

HA – humane Astrozyten

hBPV – humane cerebrale vaskuläre Perizyten

6.1.2 Chemikalien und Reagenzien

	Bezeichnung	Lieferant/Hersteller
Medien/Zellkultur	DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium (41966-029)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
	DPBS ^{-/-} , Dulbecco's Phosphate Buffered Saline ^{-/-} (14190-094)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
	EBM-2, Endothelial Basal Medium 2 (C-22211)	Promocell GmbH (Heidelberg, Deutschland)
	EGM-2, Endothelial Cell Growth Medium 2, Ready-to-use (C-22011)	Promocell GmbH (Heidelberg, Deutschland)
	FCS, Fetal Calf Serum (Nr. 10500064)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
	Pen/Strep, Penicillin/Streptomycin (15140122)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
	Trypsin-EDTA, 0,25 % (Nr. 25200056)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
Chemikalien	5-Norbonen-2-carbonsäure (NO667)	TCI Chemicals (Tokyo, Japan)
	Agar-Agar (212304)	Otto Nordwald GmbH (Hamburg, Deutschland)
	Calcein-AM (C-3099)	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltheim, USA)
	Celltracker Green CMFDA (C2925)	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltheim, USA)
	Celltracker Red CMTPX (C34552)	ThermoFisher Sjetcientific Inc. (Waltheim, USA)

D ₂ O, Deuteriumoxid (151882-100G)	Sigma-Aldrich (St.Lewis, USA)
DMSO, Dimethylsulfoxid (A994)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
DTT, Dithiotreitol (6908)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
EDC-HCl (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid) (2156)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure (8043)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol absolut (20821.296)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
FDA, Fluorescein Diacetat (F7378)	Sigma-Aldrich (St.Lewis, USA)
Gelatine Typ A (G2500-100G)	Sigma-Aldrich (St.Lewis, USA)
Glycin (3187)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
HCl, Salzsäure (H1758)	Sigma-Aldrich (St.Lewis, USA)
Hefeextrakt (2363)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Hoechst 33342 (H3570)	Molecular Probes®, Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Irgacure D-2959, 2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxyl-2-methylpropiofenon) (410896-10G)	Sigma-Aldrich (St.Lewis, USA)
KHCO ₃ , Kaliumhydrogencarbonat (P748)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Kollagen I, rat tail (ALX-522-435-0100)	Enzo Life Sciences (Lörrach, Deutschland)
LAP, Lithium-Phenyl-(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinat (L0290)	TCI Chemicals (Tokyo, Japan)
LIVE/DEAD™ Viabilitäts-/Zytoxizitäts-Kit, für Säugetierzellen (L3224)	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltheim, USA)
MES, 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (4256)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Methacrylsäureanhydrid (276685-500ML)	Sigma-Aldrich (St.Lewis, USA)
Methanol (1060091000)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
MTT, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromid (G4100)	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
Na ₂ CO ₃ , Natriumcarbonat (8563)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
NaCl, Natriumchlorid (3957)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
NaHCO ₃ , Natriumhydrogencarbonat (6885)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
NaOH, Natriumhydroxid (P031)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

NH ₄ Cl, Ammoniumchlorid (5050)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
NHS, N-Hydroxysuccinimid (130672-100G)	Sigma-Aldrich (St.Lewis, USA)
NHT, N-Acetylhomocysteinethiolacton (A16602-25G)	Sigma-Aldrich (St.Lewis, USA)
PrestoBlue Reagenz (A13262)	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltheim, USA)
Propidiumiodid (P4170)	Sigma-Aldrich (St.Lewis, USA)
SDS, Sodiumdodecylsulfat (4360)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Solubilization Solution Stop Mix (G4100)	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
TNBSA (P2297-10ML)	Sigma-Aldrich (St.Lewis, USA)
Triton X-100 (T-9284)	Sigma-Aldrich (St.Lewis, USA)
Trypton (8952)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

6.1.3 Zusammengesetzte Chemikalien/Medien

	<i>Zusammensetzung</i>
Trypsininhibitor	<ul style="list-style-type: none"> • 10 % FCS • 90 % DPBS^{-/-}
Einfriermedium HepG2 und NHDF	<ul style="list-style-type: none"> • 50 % FCS • 40 % DMEM • 10 % DMSO
Einfriermedium HUVEC	<ul style="list-style-type: none"> • 50 % FCS • 40 % EGM-2 • 10 % DMSO
Natrium-Carbonat-Bicarbonatpuffer GeIS Synthese	<ul style="list-style-type: none"> • 60 % Na₂CO₃ (0,1 M) • 40 % NaHCO₃ (0,1 M)
Natrium-Carbonat-Bicarbonatpuffer TNBSA-Assay	<ul style="list-style-type: none"> • 95 % NaHCO₃ (0,1 M) • 5 % Na₂CO₃ (0,1 M)
LB-Agar	<ul style="list-style-type: none"> • 5 g/l Hefeextrakt • 10 g /l Trypton • 10 g/l NaCl • 15 g/l Agar

Kulturmedium hCMEC

- 500 ml EBM-2
- 5 ml P/S
- 2,5 % FCS
- 125 µl Ascorbinsäure (EGM-2 Zusatz)
- 125 µl bFGF (EGM-2 Zusatz)
- 125 µl EGF (EGM-2 Zusatz)
- 125 µl IGF-1 (EGM-2 Zusatz)
- 125 µl VEGF (EGM-2 Zusatz)
- 0,55 µM Hydrocortison (EGM-2 Zusatz)

Differenzierungsmedium hCMEC

- 500 ml EBM-2
- 125 µl Ascorbinsäure (EGM-2 Zusatz)
- 0,25 % FCS
- 0,55 µM Hydrocortison (EGM-2 Zusatz)
- 5 ml P/S

6.1.4 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller/Lieferant
8-Well µ-Slide, ibiTreat	ibidi (Martinsried, Deutschland)
Adhäsionsobjektträger, Q-Path plus	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Bakterienpetrischalen 100 mm, PS	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Kryoröhrchen 2 ml, mit Silikonring	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Deckgläschen rund, Durchmesser 32 mm	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Dialyseschläuche, 14 kDa, Cellulose-Membran, Breite 43 mm	Sigma-Aldrich (St.Lewis, USA)
Einmalspritzen Omnifix 1 ml	B.Braun (Melsungen, Deutschland)
Falconröhrchen, 15/50 ml	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Kartusche, Optimum, 3cc, klar	Nordson EFD (Erkrath, Deutschland)
Kartusche, Optimum, 3cc, schwarz	Nordson EFD (Erkrath, Deutschland)
Kartuschenadapter, Optimum für 3 cc Kartuschen	Nordson EFD (Erkrath, Deutschland)
Kartuschenverschluss unten, drehbar	Nordson EFD (Erkrath, Deutschland)
Klebeband VHB™	Scotch (Saint Paul, USA)
Messpipetten, AR-Glas, 5/10/20 ml	Brand GmbH (Wertheim, Deutschland)
Nadeln 0,15 mm lila, konisch, standard	Vieweg GmbH (Kranzberg, Deutschland)
Nadeln 0,25 mm rot, konisch, standard	Vieweg GmbH (Kranzberg, Deutschland)

Nadeln, 0,41 mm blau, konisch, standard	Vieweg GmbH (Kranzberg, Deutschland)
Parafilm M, 4 in.*125 ft. Roll	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Pasteurpipetten, Natron-Kalk-Glas	Brand GmbH (Wertheim, Deutschland)
Pipettenspitzen Next Generation Reloadsystem 1-10 µl/ 10-200µl	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Pipettenspitzen, blau, 100-1000 µl	Corning Inc. (NY, USA)
Polycarbonatfolie Fluenz 10 ⁶ Ionen/cm ²	It4ip (Louvain-la-Neuve, Belgien)
Pumpenschlauch Tygon 3350, Innendurchmesser 0,76 mm	Saint-Gobain Performance plastics (Courbevoie, Frankreich)
Reaktionsgefäße, farblos 0,5/1,5/2,0 ml	Eppendorf AG (Wesseling, Deutschland)
Reaktionsgefäße, schwarz 1,5 ml	Eppendorf AG (Wesseling, Deutschland)
Rotilabo®-Einmalküvetten	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Spritzen Inkjet, 1, 5, 10 ml	B.Braun (Melsungen, Deutschland)
Sterican® Einmalinjektionskanülen	B.Braun (Melsungen, Deutschland)
Sterilfilter, Rotilabo®, Porengröße 0,22 µm	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Stopfen, 3cc, rot	Nordson EFD (Erkrath, Deutschland)
Verschlusskappe oben, blau, für 3cc Kartuschen	Nordson EFD (Erkrath, Deutschland)
Zählkammer, Neubauer	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG (Lauda, Deutschland)
Zellkultur Multiwellplatte Cellstar® 6/12/24/48/96 Well, PS, F-Boden, Transparent	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Zellkulturflasche Cellstar® 75 cm ² , 175 cm ² , Filterschraubverschluss	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Zellkulturschalen Cellstar®, 35 mm, 60 mm, 100 mm, PS	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

6.1.5 Geräte

Anwendung	Gerät	Hersteller
Zellkultur	Absaugpumpe Integra Vacusafe	INTEGRA Biosciences GmbH (Biebertal, Deutschland)
	CO ₂ -Inkubator, C170	BINDER GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
	ENVAIReco® air Werkbank	ENVAIR (Emmingen, Deutschland)
	Mehrkanalpipetten 1-10µl/20-200 µl	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	Pipetten Eppendorf Research Plus 1-10 µl/10-100 µl/100-1000 µl	Eppendorf AG (Wesseling, Deutschland)
	Wärmeschrank UN55	Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Zentrifuge	Mikrozentrifuge Mikro20	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
	Zentrifuge Megafuge 2.0R Heraeus Sepatech	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Mikroskope	Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)
	Konfokalmikroskop Leica TCS SPE	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)
	Mikroskop Axio Observer Z1	Carl Zeiss GmbH (Jena, Deutschland)
Weitere Geräte	3D-Drucker 3D Discovery Gen 1	regenHU (Villaz-St-Pierre, Schweiz)
	Absorptionsspektrometer SmartSpec™ 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
	Feinwaage PR 124	OHAUS Europe GmbH (Nänikon, Schweiz)
	Kühlsystem für 3D Discovery, Umwälzkühler Huber Pilot One	Peter Huber Kältemaschinenbau AG (Offenburg, Deutschland)
	Lampe OSRAM Ultra Vitalux 300W E27	Osram Licht AG (München, Deutschland)
	Lyophilisator	LSL Secroid (Aclens, Schweiz)
	Magnetrührer mit Heizplatte VWR Advanced	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	NMR Spektrometer AVANCE 400	Bruker BioSpin GmbH (Rheinstetten, Deutschland)
	Omicure R2000 UV Radiometer	igb-tech GmbH (Friedelsheim, Deutschland)

pH-Meter	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Punktstrahler Omnicure S2000 (Lichtleiter 320 – 500 nm)	igb-tech GmbH (Friedelsheim, Deutschland)
Rheometer Physica MCR 501	Anton Paar Germany GmbH (Ostfildern-Scharnhausen, Deutschland)
SpectraMax iD3 Mikroplattenleser	Molecular Devices, LLC. (San Jose, USA)
Spritzenpumpe, Fusion 200 Classic Syringe Pump	Chemyx (Stafford, USA)
Thermomixer 5436	Eppendorf AG (Wesseling, Deutschland)
Vortexmischer Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH + Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Wasserbad	Köttermann Labortechnik (Hänigsen, Deutschland)

6.1.6 Software

Ansys Fluent 2019R2

Bildauswertungssoftware Python

ChemOffice Professional

Fiji ImageJ

Leica Application Suite

Microsoft Office

OriginPro 9.1G

RheoCompass

TopSpin 4.0.6

6.2 Methoden

6.2.1 Zellkultur HepG2

6.2.1.1 Kultivierung von HepG2

Zur Kultivierung der HepG2 wurde die Zelllinie aus der Lagerung bei -196 °C entnommen, bei 37 °C aufgetaut und in eine Kulturflasche mit vorgelegtem Kulturmedium gegeben. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, da sich das im Einfriermedium enthaltene DMSO schädlich auf die Zellen auswirken kann. Für den Mediumwechsel wurde das vorhandene Medium verworfen und die Zellschicht mit 10 ml DPBS⁻ gewaschen. Anschließend wurden 10 ml neues Kulturmedium zugegeben. Die Kultivierung der HepG2 Zelllinie erfolgte adhärent in 75 cm²-Kulturflaschen im Inkubator bei 5 % CO₂ Gehalt, 37 °C und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Als Kulturmedium diente DMEM, zu welchem 10 % FCS und 1 % Antibiotika (Pen/Strep) zugegeben wurde. Die Kulturen wurden zweimal pro Woche im Verhältnis 1:10 oder 1:5 passagiert, nachdem sich ein konfluentes Zellwachstum eingestellt hatte. Dazu wurde das alte Medium in den Kulturflaschen entfernt und die Zellschicht mit 10 ml DPBS gewaschen. Nach Entfernen des DPBS wurde die Zellschicht mit 1 ml Trypsin-EDTA (0,25 %) behandelt und für ca. 3 min bei 37 °C inkubiert, um eine optimale Wirkungsweise des Trypsins zu gewährleisten. Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Ablösen der Zellen von der Kulturflasche überprüft und durch Klopfen mit der Hand vervollständigt. Durch Zugabe von DMEM wurde die Wirkung von Trypsin gestoppt. Dabei wurde mindestens die doppelte Menge des Kulturmediums zugegeben, um die enzymatische Reaktion gezielt zu beenden. Die gewünschte Menge wurde nun in eine neue Zellkulturflasche mit vorgelegtem Medium überführt und der nicht benötigte Rest verworfen.

6.2.1.2 Einfrieren der HepG2

Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst mit DPBS⁻ gewaschen und trypsiniert (wie in Kapitel 6.2.1.1 beschrieben). Nachdem die Wirkung des Trypsins mit DMEM abgestoppt wurde, wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellsuspension zentrifugiert (1200 rpm, 3 min). Das dadurch erhaltene Zellpellet wurde anschließend in Einfriermedium (50 % FCS, 40 % DMEM und 10 % DMSO) resuspendiert, sodass eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml erhalten wurde. Jeweils 1 ml der Lösung wurde in ein Cryovial überführt und direkt in einen mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter gesetzt, welcher anschließend mit 1 °C/ min auf -80 °C abgekühlt wurde. Die Zellen wurden langfristig bei -196 °C gelagert.

6.2.2 Zellkultur NHDF

6.2.2.1 Kultivierung von NHDF

Zur Kultivierung der NHDF wurden diese aus der Lagerung bei -196 °C entnommen und für eine Minute bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in

eine 175 cm² Zellkulturflasche mit vorgelegtem DMEM überführt. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel. Die Kultivierung der Zellen erfolgte adhärent in Zellkulturflaschen (175 cm²) bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Als Kulturmedium diente DMEM mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep. Zum Passagieren der Zellen wurde das DMEM entnommen, die Zellschicht vorsichtig mit 20 ml DPBS^{-/-} gewaschen und im Anschluss 2 ml Trypsin-EDTA (0,25 %) in die Flasche gegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 3 min bei 37 °C. Anschließend wurde das Ablösen der Zellen überprüft und durch vorsichtiges Klopfen mit der Hand vervollständigt. Durch Zugabe von DMEM wurde die Wirkung des Trypsins abgestoppt. Die gewünschte Menge an Zellsuspension wurde in eine neue Flasche mit vorgelegtem DMEM überführt und nicht benötigte Reste verworfen.

6.2.2.2 Einfrieren der NHDF

Der Einfriervorgang verlief analog zum Einfrieren der HepG2-Zellen (Siehe Kapitel 6.2.1.2).

6.2.3 Zellkultur HUVEC

6.2.3.1 Kultivierung von HUVEC

Zur Kultivierung der HUVEC wurden diese aus der Lagerung bei -196 °C entnommen und für eine Minute bei 37 °C aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon mit vorgelegtem Trypsininhibitor (10 % FCS, 90 % DPBS^{-/-}) überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (1200 rpm, 3 min) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 1 ml EGM-2 Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde danach in eine Zellkulturflasche mit vorgelegtem EGM-2 Medium überführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte adhärent in Zellkulturflaschen (75 cm²) bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Als Kulturmedium diente EGM-2 Ready-to-Use mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep. Die Kulturen wurden einmal pro Woche im Verhältnis 1:2 oder 1:3 passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium entnommen und die Zellschicht zweimal mit jeweils 5 ml DPBS^{-/-} gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden 0,5 ml DPBS^{-/-} und 0,5 ml Trypsin-EDTA (0,25 %) in die Flasche gegeben und für 3 min bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Ablösen der Zellen überprüft und durch Klopfen mit der Hand vervollständigt. Die Wirkung des Trypsins wurde durch Zugabe von 2 ml Trypsininhibitor gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon überführt und die Zellkulturflasche zweimal mit 2 ml EGM-2 nachgespült und ebenfalls in das Falcon überführt. Nach der Zentrifugation (1200 rpm, 3 min) wurde der Überstand abgenommen und das erhaltene Zellpellet in 1 ml EGM-2 resuspendiert. Anschließend wurde die gewünschte Menge an Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche mit vorgelegtem EGM-2 überführt.

6.2.3.2 Einfrieren der HUVEC

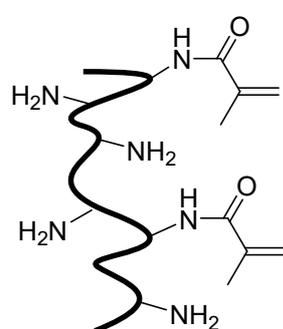
Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst mit DPBS^{-/-} gewaschen und trypsiniert. Nachdem die Wirkung des Trypsins mit Trypsininhibitor abgestoppt wurde, wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellsuspension zentrifugiert (1200 rpm, 3 min). Das dadurch erhaltene Zellpellet wurde

anschließend in Einfriermedium (50 % FCS, 40 % EGM-2 und 10 % DMSO) resuspendiert, sodass eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml erhalten wurde. Jeweils 1 ml der Lösung wurde in ein Cryovial überführt und direkt in einen mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter gesetzt, welcher anschließend mit $1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ auf $-80\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt wurde. Die Zellen wurden langfristig bei $-196\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

6.2.4 Chemische Synthese der Photopolymere

Die Synthese der verschiedenen Gelatine-basierten Photopolymere erfolgte durch Funktionalisierung der freien Aminogruppen der Lysinseitenketten der Gelatine.

6.2.4.1 GelMA-V1



Zur Synthese des Photopolymers GelMA-V1 wurden zunächst 10 g Gelatine bei $50\text{ }^\circ\text{C}$ in DPBS^{-/-} gelöst. Anschließend wurden, je nach gewünschtem Funktionalisierungsgrad (siehe Tabelle 8), 1,5 ml, 5 ml oder 8 ml Methacrylsäureanhydrid sehr langsam mit Hilfe einer Einmalspritze zur Gelatinelösung tropfenweise zugegeben und für 2 h bei $50\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Lösung mit 100 ml warmem DPBS^{-/-} verdünnt und für weitere 10 min gerührt. Anschließend wurde die Lösung in zuvor eingeweichte, auf Dichtigkeit geprüfte und einseitig verschlossene Dialyseschläuche (Cellulose, 12-

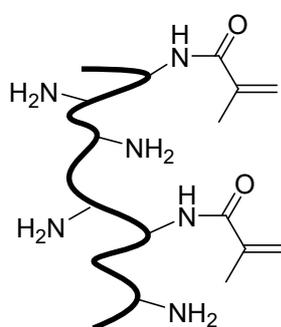
14 kDa) überführt und für 7 Tage bei $40\text{ }^\circ\text{C}$ gegen ddH₂O dialysiert. Dabei fand zweimal täglich ein Wasserwechsel statt. Nach Ende der Dialyse wurde die Lösung in 50 ml Falcons überführt und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Nach zweitägiger Lyophilisation wurde das Photopolymer GelMA in Form eines weißen Feststoffs erhalten. Dieser wurde bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): $\delta/\text{ppm} = 5,75$ (H_a), 5,5 (H_b), 3,1 (bs, NH₂), 1,9 (s, CH₃)

Tabelle 8: Methacrylierung von Gelatine zur Synthese von GelMA-V1. Die angegebenen Mengen beziehen sich jeweils auf 1 g Gelatine.

Funktionalisierungsgrad	Äq (MAA)	n (MAA) [mmol]	V (MAA) [μl]
Low	3,8	1,01	150
Medium	12,6	3,35	500
High	20,2	5,36	800

6.2.4.2 GelMA-V2



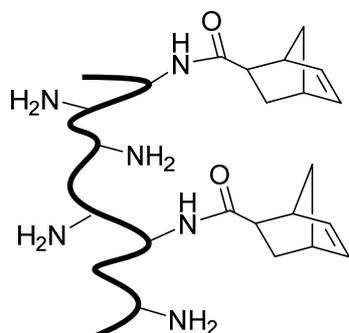
Zur Synthese des Photopolymers GelMA-V2 wurde zunächst 1 g Gelatine in 10 ml DPBS^{-/-} bei 50 °C gelöst. Anschließend wurde die gewünschte Menge an MAA (siehe Tabelle 9) langsam mit Hilfe einer Einmalspritze zugetropft und für 2 h bei 50 °C gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Lösung mit 10 ml erwärmtem DPBS^{-/-} verdünnt und für weitere 10 min gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung in vorbereitete Dialyseschläuche (Cellulose, 12-14 kDa) überführt und für 7 Tage gegen ddH₂O dialysiert. Anschließend wurde die Lösung in Falcons überführt und bei -80 °C gelagert. Nach zweitägiger Lyophilisation wurde das Produkt als weißer Feststoff erhalten, welcher bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert wurde.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ/ppm = 5,8 (H_a), 5,6 (H_b), 3,3 (bs, NH₂), 2,23 (s, CH₃)

Tabelle 9: Methacrylierung von Gelatine zur Synthese von GelMA-V2 in Abhängigkeit der Äquivalente (Äq). 1 Äquivalent entspricht 0,266 mmol NH₂-Gruppen pro 1 g Gelatine. Die angegebenen Mengen beziehen sich jeweils auf 1 g Gelatine. Die resultierenden Funktionalisierungsgrade Low, Medium und High sind dem entsprechenden Äquivalent zugeordnet.

Funktionalisierungsgrad	Äq (MAA)	n (MAA) [mmol]	V (MAA) [μl]
-	0,5	0,133	19,8
Low	1	0,266	39,5
-	2	0,532	79
-	4	1,064	158
Medium	8	2,128	316
-	10	2,66	395
-	12	3,192	474
-	16	4,256	632
High	20	5,32	790
-	30	7,98	1185

6.2.4.3 GeINB



Zur Synthese des Photopolymers GeINB wurden 5-Norbornene-2-carboxylsäure (NCS), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid (EDC-HCl) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) im Verhältnis 1:2:1 in 10 ml MES-Puffer (0,5 M, pH 6) gelöst. Die jeweiligen Mengen sind Tabelle 10 zu entnehmen. Die Lösung wurde für 15 min bei 50 °C gerührt. Anschließend wurde 1 g Gelatine hinzugegeben. Nachdem diese gelöst war, wurde der pH-Wert des Reaktionsgemischs mit NaOH auf 7,5-7,8 eingestellt. Die Lösung wurde über Nacht bei 50 °C gerührt und am

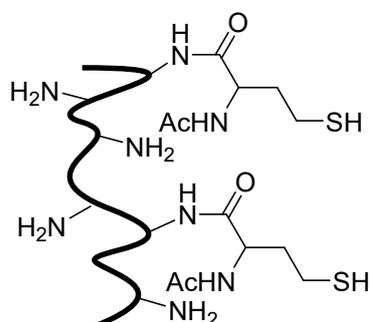
nächsten Tag in vorbereitete Dialyseschläuche (Cellulose, 12-14 kDa) überführt. Die Dialyse erfolgte für 7 Tage bei 40 °C gegen ddH₂O, wobei das Wasser zweimal täglich gewechselt wurde. Nach der Aufreinigung wurde die Reaktionslösung in Falcons überführt und zentrifugiert (4000 rpm, 5 min), um eventuelle Reaktionsrückstände zu entfernen. Das Produkt wurde bei -80 °C eingefroren, für zwei Tage lyophilisiert und der entstandene weiße Feststoff bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ/ppm = 7,6-7,4 (H_{aromat.} Gelatine), 6,44 (H_a, endo), 6,39 (H_{a'}, exo), 6,37 (H_{b'}, exo), 6,11 (H_b, endo), 5,24-0,99 (Gelatine), 3,20 (bs, NH₂)

Tabelle 10: Funktionalisierung von Gelatine mit Norbornencarboxylsäure zur Synthese von GelNB in Abhängigkeit der Äquivalente. 1 Äquivalent entspricht 0,266 mmol NH₂-Gruppen pro 1 g Gelatine. NCS, EDC-HCl und NHS stehen im Verhältnis 1:2:1. Die angegebenen Mengen beziehen sich jeweils auf 1 g Gelatine. Die resultierenden Funktionalisierungsgrade Low, Medium und High sind dem entsprechenden Äquivalent zugeordnet.

Funktionalisierungsgrad	Äq (NCS)	n (MAA) [mmol]	V (MAA) [μl]	m (EDC-HCl) [mg]	m (NHS) [mg]
-	0,1	0,0266	3,3	10,2	3,1
Low	0,3	0,0798	9,8	30,6	9,2
-	0,5	0,133	16,3	51,0	15,3
Low	1	0,266	32,6	102,0	30,6
Medium	2	0,532	65,1	204,0	61,2
-	2,5	0,665	81,4	254,9	76,5
-	3	0,798	97,7	305,9	91,8
-	3,5	0,931	113,9	356,9	107,1
-	4	1,064	130,2	407,9	122,5
-	8	2,128	260,4	815,9	244,9
High	10	2,66	325,5	1019,8	306,1

6.2.4.4 GeIS



Zur Synthese des Photopolymers GeIS wurde 1 g Gelatine und eine Spatelspitze Ethylendiamintetraacetat (EDTA) in einem Schlenkcolben vorgelegt. Dieser wurde daraufhin dreimal evakuiert und mit Argon gespült. Anschließend wurden 10 ml Natriumhydrogencarbonatpuffer (entgast, CO₂-frei) hinzugegeben und die Suspension bis zum vollständigen Lösen der Gelatine bei 40 °C gerührt. Die benötigte Menge N-Acetylhomocysteinethiolacton wurde in ca. 1,5 ml Puffer gelöst und zur Gelatinelösung gegeben. Die benötigte Menge ist Tabelle 11 zu entnehmen.

Die Lösung wurde für 3 h unter Argonatmosphäre bei 40 °C gerührt und anschließend mit 10 ml ddH₂O verdünnt und in vorbereitete Dialyseschläuche überführt. Die Dialyse erfolgte für 24 h bei 40 °C gegen ddH₂O und unter Schutzgasatmosphäre. Der Wasserwechsel erfolgte drei- bis viermal. Bei den ersten zwei Wechsellvorgängen wurde zusätzlich noch EDTA zugegeben. Nach der Aufreinigung wurde das Produkt bei -80 °C eingefroren und lyophilisiert. Als Produkt wurde ein weißer Feststoff erhalten, der bis zur Verwendung bei -80 °C und unter Schutzgas gelagert wurde.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ/ppm = 7,6-7,40 (H_{aromat.}, Gelatine), 5,24-0,99 (Gelatine), 3,20 (bs, NH₂), 2,23 (s, CH₃)

Tabelle 11: Funktionalisierung von Gelatine mit N-Homocysteinethiolacton (NHT) zur Synthese von GeIS in Abhängigkeit der Äquivalente. 1 Äquivalent entspricht 0,266 mmol NH₂-Gruppen pro 1 g Gelatine. Die angegebenen Mengen beziehen sich jeweils auf 1 g Gelatine. Die resultierenden Funktionalisierungsgrade Low und Medium sind dem entsprechenden Äquivalent zugeordnet.

Funktionalisierungsgrad	Äq (NHT)	n (NHT) [mmol]	m (NHT) [mg]
Low	1	0,266	42,4
-	3	0,798	127,1
Medium	5	1,33	211,8
-	10	2,66	423,5

6.2.5 Charakterisierung der Photopolymere und Hydrogele

6.2.5.1 TNBSA-Assay zur Bestimmung der freien Aminogruppen in Gelatine

Zur quantitativen Bestimmung der freien ϵ -Aminogruppen in Gelatine wurde ein TNBSA-Assay durchgeführt. Dafür wurde zunächst eine Glycin-Standardkurve erstellt. Für die dafür benötigte Verdünnungsreihe wurde Glycin in verschiedenen Konzentrationen (2-12 $\mu\text{g/ml}$) in Natriumhydrogencarbonatpuffer (0,1 M, pH 8,5) gelöst. Zusätzlich wurde eine Gelatine-Lösung mit einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ in dem Puffer hergestellt. Zu 500 μl der jeweiligen Glycin- und Gelatine-Lösung wurden 250 μl TNBSA (0,02 %) gegeben und die Proben für 4 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Reaktion mit je 125 μl HCl (1 M) und 250 μl SDS (10 %) abgestoppt. Für jede der Lösungen dienten 500 μl der jeweiligen Protein-/ Aminosäurelösung, versetzt mit 125 μl HCl (1M) und anschließend 250 μl TNBSA (0,02 %), als Blank. Die Blanks wurden nach Zugabe des TNBSA unter denselben Bedingungen inkubiert wie die Proben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden zu den Blanks jeweils 250 μl SDS (10 %) zugegeben. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 335 nm mit einem Photometer. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt. Mit den Absorptionswerten der Glycin-Verdünnungsreihe wurde eine Standardkurve erstellt, aus deren Funktion die durchschnittliche Stoffmenge freier ϵ -Aminogruppen pro Gramm Gelatine bestimmt wurde.¹⁹³

6.2.5.2 TNBSA-Assay zur Bestimmung des Funktionalisierungsgrades

Zur Ermittlung des Funktionalisierungsgrads der verschiedenen synthetisierten Gelatinederivate wurde ein TNBSA-Assay durchgeführt. Hierzu wurden die zu analysierenden Polymere sowie nicht-funktionalisierte Gelatine in einer Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ in Natriumhydrogencarbonatpuffer (0,1 M, pH 8,5) gelöst. 500 μl der Lösung wurden daraufhin mit jeweils 250 μl TNBSA (0,02 %) versetzt und für 4 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Als Blank dienten 500 μl der Lösung, die mit 125 μl HCl (1 M) und 250 μl TNBSA (0,02 %) versetzt wurden. Diese wurden unter denselben Bedingungen wie die Polymerproben inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Polymerproben mit 125 μl HCl (1 M) und 250 μl SDS (10 %) versetzt. Zu den Blanks wurden jeweils 250 μl SDS (10 %) gegeben. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 335 nm. Alle Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt. Der Funktionalisierungsgrad wurde mit nachfolgender Formel berechnet:

$$\text{Funktionalisierungsgrad [\%]} = \left(1 - \frac{A_{\text{Gelatinederivat}}}{A_{\text{Gelatine}}}\right) * 100 \% \quad \text{Formel (1)}$$

6.2.5.3 Absorptionsmessung der Photoinitiatoren LAP und Irgacure D-2959

Zur genauen Charakterisierung des Absorptionsmaximums der Photoinitiatoren Irgacure D-2959 und LAP in DPBS^{-/-} als Lösungsmittel wurde eine Absorptionsmessung durchgeführt. Dafür wurden die beiden Stoffe zunächst in einer Konzentration von 0,1 % in DPBS^{-/-} gelöst und anschließend jeweils 1 ml der Lösung in Küvetten überführt. Als Blank diente DBPS^{-/-}. Es wurde jeweils ein Spektrum von 200 bis 400 nm in 10 nm Schritten mit einem Photometer (SmartSpec 3000, BioRad GmbH) aufgenommen.

6.2.5.4 Herstellung der Hydrogele

Für die Herstellung der Hydrogele wurden die lyophilisierten Photopolymere GelMA-V1, GelMA-V2 und GelNB in DPBS^{-/-} bei 40-50 °C gelöst, sodass eine 10 %ige Stammlösung erhalten wurde. Das lyophilisierte Photopolymer GelS wurde in DPBS^{-/-} bei 70 °C gelöst, sodass eine 5 %ige Stammlösung erhalten wurde. Die Stammlösungen wurden dann mit DPBS^{-/-}, Crosslinker und Photoinitiator so verdünnt, dass die Photopolymerkonzentration im Hydrogel 5 % entsprach. Die Aushärtung der Lösungen zum Hydrogel erfolgte durch Bestrahlung mit 500 mW/cm² der Wellenlängen 320-500 nm mit dem Aushärtungssystem Omnicure S2000. Die finalen Zusammensetzungen der Hydrogele, sowie die Aushärtungszeiten sind Tabelle 12, Tabelle 13 und Tabelle 14 zu entnehmen.

Tabelle 12: Finale Zusammensetzung der GelMA-V1- und GelMA-V2-Hydrogele. Die Aushärtungszeit bezieht sich auf 2 mm hohe Gele, bestrahlt mit Omnicure S2000 (320-500 nm, 500 mW/cm²).

Photopolymer [5 %]	Crosslinker	Photoinitiator	Aushärtungszeit [s]
<i>GelMA-V1 low</i> (3,8 Äq)	-	0,3 % LAP	30
<i>GelMA-V1 medium</i> (12,6 Äq)	-	0,3 % LAP	30
<i>GelMA-V1 high</i> (20,2 Äq)	-	0,3 % LAP	30
<i>GelMA-V2 low</i> (1 Äq)	-	0,3 % LAP	30
<i>GelMA-V2 medium</i> (8 Äq)	-	0,3 % LAP	30
<i>GelMA-V2 high</i> (20 Äq)	-	0,3 % LAP	30

Tabelle 13: Finale Zusammensetzung der GelNB/DTT-Hydrogele. Die Aushärtungszeit bezieht sich auf 2 mm hohe Gele, bestrahlt mit Omnicure S2000 (320-500 nm, 500 mW/cm²).

Photopolymer [5 %]	Crosslinker	Photoinitiator	Aushärtungszeit [s]
GelNB low (1 Äq)	5,4 mM DTT	0,03 % LAP	20
GelNB medium (2 Äq)	8 mM DTT	0,03 % LAP	20
GelNB high (10 Äq)	15 mM DTT	0,03 % LAP	20

Tabelle 14: Finale Zusammensetzung der GelNB/GelS-Hydrogele. Die Aushärtungszeit bezieht sich auf 2 mm hohe Gele, bestrahlt mit Omnicure S2000 (320-500 nm, 500 mW/cm²).

Photopolymer 1 [2,5 %]	Photopolymer 2 [2,5 %]	Mischungsverhältnis Photopolymere [%]	Photoinitiator	Aushärtungszeit [s]
GelNB low (0,3 Äq)	GelS low (1 Äq)	50 : 50	0,03 % LAP	10
GelNB medium (2 Äq)	GelS medium (5 Äq)	50 : 50	0,03 % LAP	10
GelNB high (10 Äq)	GelS medium (5 Äq)	35 : 65	0,03 % LAP	10

6.2.5.5 Untersuchung der Aushärtungszeiten der Hydrogele

Zur Charakterisierung der Aushärtungszeiten der verschiedenen Gelatine-basierten Hydrogele mit dem Omnicure S2000 wurden Aushärtungstests durchgeführt. Dafür wurden Photopolymerlösungen von GelMA-V1, GelMA-V2, GelNB/DTT und GelNB/GelS (5 % in DPBS⁻) mit verschiedenen Konzentrationen an LAP (0,3 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,03 % und 0,01 %) angesetzt und jeweils 70 µl der Lösung in ein Well einer 96-Well-Platte gegeben. Anschließend wurde die Platte unter der Aushärtungslampe Omnicure S2000 platziert (500 mW/cm², Abstand Lichtleiter-Platte: 5 cm) und die Zeit bis zur Vernetzung des Hydrogels bestimmt. Nach 2-5 Sekunden wurde die Aushärtung optisch überprüft. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt.

6.2.5.6 Sterilitätsbestimmung der Hydrogele

Zur Untersuchung der Sterilität der verschiedenen Hydrogele bzw. Photopolymerlösungen wurden diese auf Agarplatten ausplattiert. Dafür wurden zunächst Agarplatten mit LB-Agar angesetzt. Nach dem Aushärten des Agars wurden die Platten bis zur Verwendung über Kopf bei 4 °C gelagert. Die Photopolymerlösungen wurden mit einer Polymerkonzentration von 5 % mit sterilem DPBS^{-/-} und unsterilem DPBS^{-/-} angesetzt (siehe Kapitel 6.2.5.4). Als Positivkontrolle wurden einige Photopolymere durch Kontakt mit dem Fußboden gezielt verunreinigt und in unsterilem DPBS^{-/-} gelöst. Anschließend wurden 100 µl der Lösung mit Hilfe von Glaskügelchen auf den Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden für 48 h bei 29 °C über Kopf inkubiert und die Anzahl an Bakterienkolonien bestimmt.

6.2.5.7 Bestimmung der Quelleigenschaften

Die Quelleigenschaften der verschiedenen Gelatine-basierten Hydrogele wurden gravimetrisch nach der Methode von Noshadi *et al.*²⁴⁰ Bestimmt. Zunächst wurden 200 µl der jeweiligen Polymerlösung in Konzentrationen von 5 % angesetzt (siehe Kapitel 6.2.5.4) und auf PDMS-beschichteten Objektträgern unter der Aushärtungslampe Omnicure S2000 zum Hydrogel vernetzt, bei -80 °C eingefroren und für 48 h lyophilisiert. Das Trockengewicht der Hydrogeltropfen wurde mit einer Feinwaage ermittelt und die Gele zum Aufquellen in 2 ml DPBS^{-/-} bei RT für 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Hydrogel aus der Flüssigkeit entnommen und das Nassgewicht bestimmt. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt bis keine Gewichtsänderung mehr festzustellen war. Das DPBS^{-/-} wurde nach jedem Wägevorgang erneuert. Die Berechnung des Flüssigkeitsgehaltes erfolgte nach Lou *et al.*, die Berechnung des Quellverhältnisses (engl. *swelling ratio*) nach Noshadi *et al.* mit folgenden Formeln:^{235,240}

$$\text{Flüssigkeitsgehalt [\%]} = \frac{m_{\text{wet}} - m_{\text{dry}}}{m_{\text{dry}}} * 100 \% \quad \text{Formel (2)}$$

$$\text{swelling ratio} = \frac{m_{\text{wet}}}{m_{\text{dry}}} \quad \text{Formel (3)}$$

6.2.5.8 Bestimmung des Degradationsverhaltens

Das Degradationsverhalten der verschiedenen Hydrogele in unterschiedlichen Lösungen wurde gravimetrisch nach der Methode von Noshadi *et al.* bestimmt.²⁴⁰ Dazu wurden zunächst 200 µl der jeweiligen Photopolymerlösung in den Konzentrationen 5 % und 10 % angesetzt (siehe Kapitel 6.2.5.4). Zum Einstellen der Polymerkonzentration wurden nun jedoch die zu untersuchenden Lagerlösungen gewählt (DMEM oder 10 % FCS in DPBS^{-/-}). Die Lösungen wurden auf PDMS-beschichteten Objektträgern unter der Aushärtungslampe Omnicure S2000 zum Gel vernetzt, bei -80 °C eingefroren und für 48 h lyophilisiert. Das Trockengewicht der Hydrogeltropfen wurde anschließend mit einer Feinwaage bestimmt und die Gele wurden in jeweils 1 ml der Lagerlösung (DMEM oder 10 % FCS in DPBS^{-/-}) bei 37 °C für bis zu 14 Tagen inkubiert. Die Lagerlösung wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Die Probenentnahme in

Triplikaten erfolgte jeweils nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 7 Tagen und 14 Tagen. Die entnommenen Gele wurden dann nochmals bei -80 °C eingefroren, für 48 h lyophilisiert und das Trockengewicht zum Zeitpunkt t bestimmt. Das verbleibende Gewicht der Hydrogele in den verschiedenen Lösungen wurde mit Hilfe der Formel 4 berechnet:

$$\text{Verbleibendes Gewicht [\%]} = \frac{m_{t0}}{m_t} * 100 \% \quad \text{Formel (4)}$$

6.2.5.9 Rheologische Charakterisierung der Photopolymerlösungen

Für die rheologische Charakterisierung der nicht-vernetzten 5 %igen Photopolymerlösungen wurden 5 ml der jeweiligen Lösung hergestellt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden die Lösungen im Wasserbad bei 40 °C erwärmt und charakterisiert. Die Bestimmung der rheologischen Eigenschaften erfolgten bei 14 °C und 37 °C mit einem Platte-Platte-Rheometer (Physica MCR 501, Anton Paar). Der Messplattendurchmesser betrug 25 mm (PP25 Messplatte, Anton Paar) für die Messungen bei 14 °C, die Messungen bei 37 °C wurden mit einer konischen Messplatte (CP50 Messplatte, Anton Paar) durchgeführt. Die Messdistanz betrug jeweils 1 mm. Für die Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften (G' , G'') wurde eine dynamische Oszillationsmessung mit einer konstanten Amplitude von 1 Pa über einen Frequenzbereich von 100 rad/s – 0,1 rad/s (logarithmische Stufen) durchgeführt. Es wurden 41 Messpunkte aufgezeichnet mit einer logarithmisch ansteigenden Messpunktdauer. Zur Ermittlung der Scherviskosität wurde ein Rotationsversuch über einen Scherratenbereich von 0,1 1/s – 2000 1/s (logarithmische Stufen) durchgeführt. Es wurden 41 Messpunkte mit einer konstanten Messpunktdauer aufgezeichnet.

6.2.5.10 Rheologische Charakterisierung der Hydrogele

Für die rheologische Charakterisierung der Hydrogele wurden Gele mit einem Durchmesser von 25 mm hergestellt. Dazu wurden jeweils 500 µl der 5 %igen Photopolymerlösung in die Wells einer 12-Well-Platte gegeben und die Lösung unter der Aushärtungslampe Omnicure S2000 zum Hydrogel vernetzt. Das vernetzte Gel wurde anschließend mit 1 ml DPBS⁻ überschichtet und mit einem Skalpell und einem Spatel vorsichtig aus der Platte gelöst und zur Lagerung in 3 cm Petrischalen überführt. Um eine Austrocknung des Gels bis zur Messung zu vermeiden wurden diese nochmals mit 0,5 – 1 ml DPBS⁻ überschichtet und bei 4 °C gelagert. Die Bestimmung der rheologischen Eigenschaften der vernetzten Hydrogele erfolgte bei 37 °C mit einem Platte-Platte-Rheometer (Physica MCR 501, Anton Paar). Der Messplattendurchmesser betrug 25 mm (PP25 Messplatte, Anton Paar) und die Messdistanz 1 mm. Für die Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften (G' , G'') wurde eine dynamische Oszillationsmessung mit einer konstanten Amplitude von 1 Pa über einen Frequenzbereich von 100 rad/s – 0,1 rad/s (logarithmische Stufen) durchgeführt. Es wurden 41 Messpunkte aufgezeichnet mit einer logarithmisch ansteigenden Messpunktdauer. Zur Ermittlung der Scherviskosität und

Fließgrenze (engl. *yield stress*) bei 37 °C wurde ein Rotationsversuch über einen Schubspannungsbereich von 0,1 Pa bis 1000 Pa (logarithmische Stufen) durchgeführt. Es wurden 41 Messpunkte mit einer konstanten Messpunktdauer aufgezeichnet.

6.2.5.11 Rheologische Charakterisierung zellbeladener Hydrogele

Für die rheologische Charakterisierung zellbeladener Hydrogele wurden Gele mit einem Durchmesser von 25 mm hergestellt. Zunächst wurden NHDF Zellen in Suspension gebracht und die Zellzahl bestimmt. Für die Gelzusammensetzung wurde eine Zellkonzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml verwendet. Die Photopolymerlösungen für die Hydrogele GelMA-V2 *medium*, GelNB/DTT *medium* und GelNB/GelS *medium* wurden wie in Kapitel 6.2.5.4 beschrieben angesetzt. Zum Einstellen der Polymerkonzentration auf 5 % wurde die vorbereitete Zellsuspension verwendet. Anschließend wurden jeweils 500 µl der Lösungen in die Wells einer 12-Well Platte gegeben und unter der Aushärtungslampe Omnicure S2000 zum Hydrogel vernetzt und mit jeweils 1 ml Kulturmedium überschichtet. Die Kultivierung der Gele erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂. Alle zwei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. An Tag 1 und an Tag 7 wurden die Gele in Triplikaten mit Hilfe eines Spatels vorsichtig aus der Platte herausgelöst und in 3 cm Petrischalen überführt und mit 1 ml Kulturmedium überschichtet. Die rheologische Charakterisierung der Hydrogele erfolgte bei 37 °C mit einem Platte-Platte-Rheometer (Physica MCR 501, Anton Paar). Der Messplattendurchmesser betrug 25 mm (PP25 Messplatte, Anton Paar) und die Messdistanz 1 mm. Zur Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften (G' , G'') wurde eine dynamische Oszillationsmessung mit einer konstanten Amplitude von 1 Pa über einen Frequenzbereich von 100 rad/s – 0,1 rad/s (logarithmische Stufen) durchgeführt. Es wurden 41 Messpunkte aufgezeichnet mit einer logarithmisch ansteigenden Messpunktdauer.

6.2.6 MTT-Assay zur Bestimmung der Toxizität von Substanzen

Zur Bestimmung der Toxizität eines bestimmten Stoffes auf eine bestimmte Zellkultur in Abhängigkeit von der Konzentration und der Inkubationszeit eignet sich die Durchführung eines MTT-Assay. Dazu wurden 1×10^4 Zellen pro Well in eine 96-Well Platte ausgesät. In jedes Well wurden 100 µl der Zellsuspension gegeben und die Platte über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um ein Anwachsen der Zellen zu gewährleisten. Am nächsten Tag wurde der zu testende Stoff bei einem Mediumwechsel in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Auch bei den Kontrollen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um alle Zellen den gleichen Bedingungen für das Wachstum auszusetzen. Anschließend erfolgte die Inkubation für die gewünschte Zeit oder zunächst ein Bestrahlungsschritt, um die Substanz zu aktivieren. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde das Medium mit der Substanz entfernt, die Zellschicht mit DPBS^{-/-} gewaschen und mit frischem Medium überschichtet und weiter inkubiert bis insgesamt 72 h erreicht waren. Daraufhin wurde die Positivkontrolle, durch Zugabe von je 5 µl Triton X-100 (20 % in ddH₂O) pro Well, lysiert. Anschließend wurden in jedes Well 10 µl des gelben MTT-Reagenz (Dye Solution) gegeben und die Platte für 3 h bei 37 °C inkubiert. Dabei können

metabolisch aktive Zellen das gelbe MTT-Reagenz zu einem violetten Formazan verstoffwechseln. Dieses befindet sich zunächst als violetter Kristall in den Zellen. Nach der Inkubationszeit wurden in jedes Well 100 µl der *Solubilization Solution* zugegeben und für weitere 24 h inkubiert. Diese bringt die violetten Kristalle in Lösung, sodass eine gleichmäßige Färbung entsteht. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 595 nm mit Hilfe eines Platten-Photometers. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten.

6.2.7 MTT-Assay zur Bestimmung der Bestrahlungstoxizität

Zunächst wurden 1×10^4 Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte mit weißen Zwischenwänden ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um ein vollständiges Anwachsen der Zellen zu gewährleisten. Es folgte zunächst ein Mediumwechsel, bevor die Platte unter der Aushärtungslampe Omnicure S2000 platziert wurde (Abstand Platte-Lichtleiter: 5 cm) und die Zellen mit verschiedenen Bestrahlungsintensitäten und Dauern belichtet wurden. Anschließend erfolgte die Inkubation für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ oder die direkte Zugabe des Tritons. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen der Tot-Kontrolle zunächst mit je 5 µl Triton X100 (20% in ddH₂O) lysiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von jeweils 10 µl MTT. Die Platte wurde für weitere 3 h inkubiert. Zum Herauslösen der violetten Formazan-Kristalle aus den Zellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit in jedes Well 100 µl der *Solubilization Solution* zugegeben und nochmals für 24 h inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 595 nm mit Hilfe eines Platten-Photometers. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt.

6.2.8 Einbettung von Zellen in Hydrogele

Zur Einbettung verschiedener Zelltypen in die Hydrogele wurden diese zunächst trypsiniert (Kapitel 6.2.1) und die Zellzahl bestimmt. Für die Einkapselung der Zellen in den Gelen wurde eine Zellkonzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml verwendet. Die Herstellung der Hydrogele erfolgte wie in Kapitel 6.2.5.4 beschrieben, anstatt DPBS^{-/-} wurde die Zellsuspension im entsprechenden Zellmedium zur Einstellung der Photopolymerkonzentration auf 5 % genutzt. Jeweils 200 µl der Photopolymerlösung wurden in die Wells eines 8-Well µ-Slides der Firma Ibidi gegeben. Nach der Aushärtung der Gele wurden diese direkt mit 200 µl Kulturmedium überschichtet. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von 21 Tagen bei 37 °C und 5 % CO₂. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Jedes Hydrogel wurde 4-fach hergestellt, sodass zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 eine Lebend/Tot-Färbung mit fluoreszenzmikroskopischer Auswertung erfolgen konnte.

6.2.9 Lebend/Tot-Färbung zur Bestimmung der Zellviabilität

6.2.9.1 Färbung von 3D eingebetteten Zellen im Hydrogel

Zur Bestimmung der Zellviabilität zu verschiedenen Zeitpunkten in den Hydrogelen wurde eine Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM und Propidiumiodid (PI) durchgeführt. Lebende, metabo-

lich aktive Zellen können durch zelleigene Esterasen Calcein-AM zu dem grünen Fluoreszenzfarbstoff Calcein umwandeln und fluoreszieren dadurch grün. PI dringt durch die geschädigte Membran nekrotischer Zellen ins Innere der Zellen ein und färbt die DNA der Zellen rot. Zur Färbung der Zellen wurde eine Lösung mit 4 μM Calcein-AM (Stock 1 mM) und 0,02 mg/ml PI (Stock 2 mg/ml) in Kulturmedium angesetzt. Für gedruckte Gele wurden jeweils 500 μl Färbelösung pro Gel, für Gele in 8-Well μ -Slides wurden jeweils 250 μl benötigt. Die Inkubation erfolgte für 25 min bei 37 °C und 5 % CO_2 . Im Anschluss wurde die Färbelösung abgenommen und die Gele zweimal mit jeweils 500 μl bzw. 200 μl DPBS^{-/-} gewaschen und mit Kulturmedium überschichtet. Die Auswertung erfolgte mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Calcein-AM: $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$, Propidiumiodid rot, $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}650 \text{ nm}$).

6.2.9.2 Quantitative Bestimmung der Zellviabilität

Zur quantitativen Bestimmung der Zellviabilität wurden die mikroskopischen Aufnahmen mit einer Bildbearbeitungssoftware basierend auf OpenCV ausgewertet.³²² Zunächst wurde ein Gauss-Filter zum Weichzeichnen der Bildsegmente angewandt, um eventuelle Rauschteile der Aufnahme zu filtern. Anschließend wurde das Bild anhand eines manuell bestimmten Schwellwertes auf Basis des Quantils der Intensitätsverteilung in ein Binärbild segmentiert. Kleinere Strukturen im Binärbild (kleiner als das Signal einer Zelle) wurden im Anschluss herausgefiltert, sodass nur Segmente bzw. Zellen mit einer bestimmten Mindestgröße betrachtet wurden. Es folgte die Berechnung statistischer Kennwerte der Zellflächen anhand der Anzahl der Pixel im Binärbild (Mittelwert, Median und Standardabweichung) der Segmentgröße. Der Mittelwert wurde dann als mittlere Größe der Zellsegmente genutzt und so die Anzahl an Zellen im Bild ermittelt. Dieser Vorgang wurde sowohl für Bilder im Rot-Kanal als auch im Grün-Kanal durchgeführt. Die Summe beider ergab die Gesamtzellzahl pro Bild, wodurch der prozentuale Anteil lebender Zellen in allen Schichten des 3D-Bildes bestimmt werden konnte.

6.2.9.3 Färbung von 3D eingebetteten Zellen im vasQchip

Zur Bestimmung der Zellviabilität zu verschiedenen Zeitpunkten der in Hydrogele eingebetteten Zellen im vasQchip, wurde eine Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM und Propidiumiodid durchgeführt. Zur Färbung der Zellen wurde eine Lösung mit 4 μM Calcein-AM (Stock 1 mM) und 0,02 mg/ml PI (Stock 2 mg/ml) in Kulturmedium angesetzt. In das untere Kompartiment des Chips wurden 500 μl der Färbelösung gegeben, in den Kanal 200 μl . Die Inkubation erfolgte für 25 min bei 37 °C und 5 % CO_2 . Die Auswertung erfolgte mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Calcein-AM: $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$, Propidiumiodid rot, $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}650 \text{ nm}$).

6.2.10 Viabilitätsbestimmung der ASC in Hydrogelen

Die Viabilitätsbestimmung von ACSs die in Hydrogele eingebettet waren erfolgte in Kooperation mit Vadym Burchak (AK Prof. Dr. Finkenzeller, Universitätsklinikum Freiburg). Zur Charakterisierung der Zellviabilität von in Hydrogelen eingebetteten Stammzellen wurden diese zunächst in Suspension gebracht und mit den vorbereiteten Photopolymerlösungen vermengt,

sodass die Polymerkonzentration 5 % betrug. Die verwendete Zellkonzentration betrug dabei 2×10^5 Zellen/ml. Das verwendete Hydrogel GelNB/GelS *low* unterschied sich in diesem Versuch jedoch in der Zusammensetzung von dem in Kapitel 6.2.5.4 beschriebenen. Als Photopolymer 1 diente GelNB *medium* (2 Äq), als Photopolymer 2 diente GelS *low* (1 Äq). Die Menge des Photoinitiators blieb unverändert. Jeweils 500 µl der Lösung wurden in die Wells einer 12-Well Platte gegeben und unter der Aushärtungslampe Osram Ultra Vitalux für 150 s zum Hydrogel vernetzt. Die Gele wurden anschließend mit jeweils 500 µl Kulturmedium überschichtet und für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für die Viabilitätsbestimmung wurde eine Lebend-Tot-Färbung mit dem *Live/Dead Viability Kit* (ThermoFisher) durchgeführt. Dafür wurde eine Färbelösung mit 2 µM Calcein-AM (Stock 4 mM) und 4 µM Ethidium-Homodimer-1 (Stock 2 mM) in DPBS^{-/-} angesetzt. Dann wurde zunächst das Kulturmedium von den Gelen entfernt und diese mit 500 µl DPBS^{-/-} gewaschen. Anschließend wurden jeweils 200 µl der Färbelösung auf die Gele gegeben und diese für 30 min bei RT im Dunklen inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop.

6.2.11 PrestoBlue-Assay zur Bestimmung der Proliferation

Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens verschiedener Zelltypen in den verschiedenen Hydrogelen wurde der PrestoBlue-Assay durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst wie in Kapitel 6.2.8 beschrieben in die verschiedenen Hydrogele eingebettet. Die flüssige Photopolymerlösung mit den Zellen wurde hierzu jedoch in eine 48-Well Platte (200 µl pro Well) oder in eine 96-Well Platte (100 µl pro Well) gegeben. Die Zellkonzentration betrug $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml. Nach der Vernetzung der Lösungen zum Hydrogel mit dem Omnicure S2000 wurden die Gele mit 300 µl (48-Well Platte) oder 150 µl (96-Well Platte) Kulturmedium überschichtet. Als Blank diente die entsprechende Photopolymerlösung ohne Zellen, zum Einstellen der Polymerkonzentration auf 5 % wurde das entsprechende Kulturmedium verwendet. Jedes Gel wurde als Triplikat auf vier verschiedene Platten aufgetragen, sodass zu den Zeitpunkten Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 eine Bestimmung des Proliferationsverhaltens stattfinden konnte. Mit den verschiedenen Blanks wurde ebenso verfahren. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel, sowohl bei den Gelen mit den Zellen als auch bei denen ohne Zellen. Um einen Startwert der Fluoreszenz zu erhalten, wurde die erste Platte 30 min nach dem Vernetzen der Hydrogele mit dem PrestoBlue-Reagenz behandelt. Dazu wurde das Medium über den Gelen vorsichtig abgenommen und die Gele mit DPBS^{-/-} gewaschen. Anschließend wurde das PrestoBlue-Reagenz 1:10 mit Kulturmedium verdünnt und 300 µl (48-Well Platte) bzw. 150 µl (96-Well Platte) der Lösung auf die Proben und die Blanks gegeben. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Lebende und metabolisch aktive Zellen können das Resazurin-basierte Reagenz zu dem roten und stark fluoreszenten Farbstoff Resorufin reduzieren. Somit kann das Proliferationsverhalten anhand der Fluoreszenzintensität verfolgt werden. Im Anschluss an die Inkubationszeit erfolgte die Fluoreszenzmessung mit einem Mikroplattenleser (Ex./Em.: 560 nm/ 600 nm, Integration Time: 400 ms).

6.2.12 Zellfärbungen

6.2.12.1 Celltracker-Färbung von Zellen

Um das Zytosol der Zellen mit Celltracker Green CMFDA oder Celltracker Red CMTPX zu färben, wurde jeweils eine Färbelösung mit einer Konzentration von 10 μM im entsprechenden Zellmedium hergestellt. Für die Färbung adhärenter Zellen in 75 cm^2 Zellkulturflaschen wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen mit 5 ml der Färbelösung überschichtet. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei 37 °C und 5 % CO_2 . Anschließend wurde die Färbelösung abgenommen, die Zellschicht mit 10 ml DPBS^{-/-} gewaschen und die Zellen für eine weitere Verwendung trypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Die Visualisierung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop (Celltracker Green CMFDA: $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510\text{-}560 \text{ nm}$, Celltracker Red CMTPX: $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 600\text{-}650 \text{ nm}$).

6.2.12.2 Färbung des Zellkerns mit Hoechst 33342

Die Färbung des Zellkerns erfolgte durch den Farbstoff Hoechst 33342. Dafür wurde zunächst eine Färbelösung mit einer Hoechst-Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ hergestellt. Für die Färbung adhärenter Zellen in 75 cm^2 Zellkulturflaschen wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen mit 5 ml der Färbelösung überschichtet. Die Inkubation erfolgte für 5 min bei 37 °C und 5 % CO_2 . Anschließend wurde die Färbelösung abgenommen, die Zellschicht mit 10 ml DPBS^{-/-} gewaschen und die Zellen für eine weitere Verwendung trypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Die Visualisierung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 410\text{-}500 \text{ nm}$).

6.2.13 3D-Biodruck

6.2.13.1 Ermittlung geeigneter Druckparameter für Hydrogele

Zur Ermittlung geeigneter Druckparameter für die verschiedenen Hydrogele wurden diese zunächst wie in Kapitel 6.2.5.4 beschrieben als 5 %ige Photopolymerlösungen mit der entsprechenden Menge an Photoinitiator und Crosslinker angesetzt und in flüssigem Zustand in Druckerkartuschen überführt und ein Kartuschenstopfen eingesetzt. Anschließend wurde die Kartusche auf beiden Seiten verschlossen und bis zur Verwendung bei 4 °C über Kopf gelagert, um Blasenbildung innerhalb der Lösung zu vermeiden. Für den Druckprozess am 3D Discovery Bioprinter der Firma regenHU wurde die Kartusche in die Halterung des Extrusionsdruckkopfes mit angeschlossenem Kühlsystem eingesetzt und eine konische Druckernadel mit einem Durchmesser von 0,15 mm angeschlossen. Um die geeignetste Drucktemperatur für die verschiedenen Hydrogele zu bestimmen, wurde die Druckbarkeit bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Dazu wurde zunächst die gewünschte Temperatur am Kühlsystem des Druckers eingestellt. Nach dem Erreichen der Temperatur wurde die Kartusche noch für weitere 30 min bei der Temperatur inkubiert, damit auch die Polymerflüssigkeit in der Kartusche die Temperatur komplett annehmen konnte. Anschließend wurde die Kartusche an die Druckluftversorgung angeschlossen und der Luftdruck manuell eingestellt, bis eine kontinuierliche

Extrusion der teilweise gelierten Photopolymerlösung stattfand. Daraufhin wurde der Druckprozess in einem schichtweisen Verfahren gestartet. Jede Schicht wurde dabei durch Belichtung mit einer Osram Ultra Vitalux Lampe zum Hydrogel vernetzt. Der Druck erfolgte auf Glasobjektträger. Die gedruckten Strukturen wurden nach Ablauf des Druckvorgangs fotografiert und analysiert. Die eingestellten Parameter für die verschiedenen Hydrogele sind Tabelle 15 bis Tabelle 18 zu entnehmen.

Tabelle 15: Druckparameter des GelMA-V1 medium-Hydrogels. Die Temperatur wurde am Kühlsystem und der passende Luftdruck manuell am Drucker eingestellt bis eine kontinuierliche Extrusion stattfand. Die Fahrgeschwindigkeit des Druckkopfes betrug jeweils 20 mm/s.

Hydrogel	Temperatur [°C]	Luftdruck [MPa]
GelMA-V1	16	0,120
	18	0,095
	20	0,085
	22	0,065
	24	0,055

Tabelle 16: Druckparameter des GelMA-V2 medium-Hydrogels. Die Temperatur wurde am Kühlsystem und der passende Luftdruck manuell am Drucker eingestellt bis eine kontinuierliche Extrusion stattfand. Die Fahrgeschwindigkeit des Druckkopfes betrug jeweils 20 mm/s.

Hydrogel	Temperatur [°C]	Luftdruck [MPa]
GelMA-V2	16	0,095
	18	0,070
	20	0,055
	22	0,050
	24	0,045

Tabelle 17: Druckparameter des GeINB/DTT medium-Hydrogels. Die Temperatur wurde am Kühlsystem und der passende Luftdruck manuell am Drucker eingestellt bis eine kontinuierliche Extrusion stattfand. Die Fahrgeschwindigkeit des Druckkopfes betrug jeweils 20 mm/s.

Hydrogel	Temperatur [°C]	Luftdruck [MPa]
GeINB/DTT	12	0,085
	14	0,065
	16	0,055
	18	0,050
	20	0,040

Tabelle 18: Druckparameter des GeINB/GeIS medium-Hydrogels. Die Temperatur wurde am Kühlsystem und der passende Luftdruck manuell am Drucker eingestellt bis eine kontinuierliche Extrusion stattfand. Die Fahrgeschwindigkeit des Druckkopfes betrug jeweils 20 mm/s.

Hydrogel	Temperatur [°C]	Luftdruck [MPa]
GeINB/GeIS	16	0,120
	18	0,110
	20	0,100
	22	0,085
	24	0,075

6.2.13.2 3D-Biodruck zellbeladener Hydrogele

Für das Bioprinting zellbeladener Hydrogele wurden die Zellen zunächst trypsinisiert und die Zellzahl bestimmt. Für den Druckprozess der Photopolymer-Lösungen wurde eine Zellkonzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml verwendet. Die Herstellung der Hydrogele erfolgte wie in Kapitel 6.2.5.4 beschrieben, anstatt DPBS^{-/-} wurde die Zellsuspension im entsprechenden Zellmedium zur Einstellung der Photopolymerkonzentration auf 5 % genutzt. Anschließend wurde die Lösung mit den Zellen in Druckerkartuschen überführt und ein Kartuschenstopfen eingesetzt. Die Kartusche wurde daraufhin von beiden Seiten mit einer Kappe verschlossen und bis zur Verwendung über Kopf bei RT gelagert, um Blasenbildung innerhalb der Lösung zu vermeiden. Für den Druckprozess wurde die Kartusche in den Extrusionsdruckkopf des 3D Discovery eingesetzt und eine konische Nadel mit einem Durchmesser von 0,15 mm an die Kartusche angeschlossen. Das Kühlsystem wurde, je nach Hydrogel, auf die geeignetste Temperatur eingestellt und die Druckluft entsprechend angepasst (siehe Tabelle 16 bis Tabelle 18, geeignetste Druckparameter sind jeweils in den Tabellen hervorgehoben). Daraufhin wurde der Druckprozess in einem schichtweisen Verfahren auf Glasobjektträger gestartet. Jede Schicht wurde dabei durch Belichtung mit einer Osram Ultra Vitalux Lampe für 30 s (GelMA-

V2) bzw. 20 s (GelNB/DTT und GelNB/GelS) zum Hydrogel vernetzt. Im Anschluss an den Druckprozess wurde der Objektträger in eine 10 cm Petrischale überführt, mit 10 ml DPBS^{-/-} gewaschen und mit 10 ml Zellmedium überschichtet. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂.

6.2.13.3 Bestimmung des Scherstress bei Extrusionsdruckprozessen

Druckprozess

Um den kritischen Scherstress, der während des Druckprozesses auf Zellen wirkt, zu bestimmen, wurden die Zellen bei verschiedenen Drücken durch verschiedene Druckernadeln mit unterschiedlichen Durchmessern (0,41 mm, 0,250 mm und 0,15 mm) gedruckt und anschließend die Zellviabilität bestimmt. Zusätzlich zu den verschiedenen Durchmessern wurde auch der Einfluss der Nadelform (zylindrisch bzw. konisch) untersucht. Dafür wurden die Zellen zunächst in Suspension gebracht und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Zellsuspension in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml (HepG2) oder $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml (HUVEC bzw. NHDF) in Druckerkartuschen überführt und der Kartuschenstopfen eingesetzt. Die Kartusche wurde auf beiden Seiten verschlossen und bis zur Verwendung über Kopf bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert. Für den Druckprozess wurde die Kartusche in den Extrusionsdruckkopf des 3D Discovery eingesetzt und die Druckernadel angebracht. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 9 verschiedenen Drücken (0,03 MPa, 0,06 MPa, 0,1 MPa, 0,15 MPa, 0,2 MPa, 0,25 MPa, 0,3 MPa, 0,35 MPa und 0,4 MPa) durch die Nadel in ein 2 ml Reaktionsgefäß gedruckt und anschließend der Anteil der lebenden Zellen über eine Propidiumiodid-Färbung bestimmt. Als Blank diente jeweils eine Zellsuspension, welche lediglich mit einer Eppendorfpipette in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt wurde. Alle Bedingungen wurden in Triplikaten untersucht.

Propidiumiodid-Färbung

Aus der beim Druckprozess aufgesammelten Zellsuspension wurden 25 µl entnommen und mit 75 µl Zellmedium verdünnt. Anschließend wurde Propidiumiodid in einer Konzentration von 0,02 mg/ml (Stock 2 mg/ml) zu der verdünnten Zellsuspension gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 10 µl der Lösung in eine Neubauer-Zählkammer überführt und die Gesamtzellzahl sowie der Anteil toter Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop Leica DMIL LED und mit Hilfe der Software ImageJ bestimmt.

Simulation des Scherstress

Die Simulation des Scherstress erfolgte in Kooperation mit Bruna Regina Maciel (Arbeitsgruppe Angewandte Mechanik, Institut für Mechanische Verfahrenstechnik, KIT). Als Simulations-Software wurde Ansys Fluent 2019R2 eingesetzt. Die Nadelgeometrien und Größen dienten dabei zusammen mit dem Extrusionsdruck und der Viskosität des Zellkulturmediums (1 mPa·s) als vorgegebene Parameter anhand derer der Scherstress simuliert wurde.

6.2.13.4 3D-Biodruck auf dem vasQchip

Für den Biodruck zellbeladener Hydrogele auf dem vasQchip wurden die Astrozyten und Perizyten zunächst trypsiniert und die jeweilige Zellzahl bestimmt. Für den Druckprozess der Photopolymer-Lösungen wurde eine Zellkonzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml verwendet. Die Herstellung der Hydrogele erfolgte wie in Kapitel 6.2.5.4 beschrieben, anstatt DPBS^{-/-} wurde die Zellsuspension im entsprechenden Zellmedium zur Einstellung der Photopolymerkonzentration auf 5 % genutzt. Anschließend wurde die Lösung mit den Zellen in Druckerkartuschen überführt und ein Kartuschenstopfen eingesetzt. Die Kartusche wurde daraufhin von beiden Seiten mit einer Kappe verschlossen und bis zur Verwendung über Kopf bei RT gelagert, um Blasenbildung innerhalb der Lösung zu vermeiden. Für den Druckprozess wurden die Kartuschen in den Extrusionsdruckkopf des 3D Discovery eingesetzt und eine konische Nadel mit einem Durchmesser von 0,15 mm an die Kartusche angeschlossen. Das Kühlsystem wurde, je nach Hydrogel, auf die geeignetste Temperatur eingestellt und die Druckluft entsprechend angepasst (siehe Tabelle 16 bis Tabelle 18, geeignetste Druckparameter sind jeweils in den Tabellen hervorgehoben). Daraufhin wurde der Druckprozess in einem schichtweisen Verfahren auf dem vasQchip gestartet. Zunächst wurde eine Schicht mit Perizyten gedruckt, gefolgt von einer Schicht mit Astrozyten. Jede Schicht wurde dabei durch Belichtung mit einer Osram Ultra Vitalux Lampe für 30 s (GelMA-V2) bzw. 20 s (GelNB/GelS) zum Hydrogel vernetzt. Zur Vermeidung von Luftblasen durch den Temperaturunterschied wurden die so bedruckten Chips vor der Beschichtung des Mikrokanals zunächst offen für eine Stunde im Inkubator äquilibriert. Um das Austrocknen des Hydrogels während dieser Zeit zu verhindern und die Versorgung der Zellen zu gewährleisten, wurden diese mit 1 ml Kulturmedium überschichtet. Anschließend wurde der poröse PC-Mikrokanal (Länge: 20 mm, Breite: 1 mm, Höhe: 300 μ m, 10^6 Poren/cm²) mit 50 μ l einer Beschichtungslösung (Kollagen I, 1 mg/ml) versetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium vorsichtig abgenommen und der Chip mit einem runden Deckglas fest verschlossen. Anschließend wurden 500 μ l Kulturmedium in das untere Kompartiment gegeben und der Mikrokanal mit jeweils 200 μ l DPBS^{-/-} und hCMEC/D3-Kulturmedium gespült.

Besiedlung des Mikrokanals

Für die anschließende Besiedlung des PC-Mikrokanals mit hCMEC/D3 Zellen wurden diese in einer Konzentration von $37,5 \times 10^5$ Zellen/ml in Suspension gebracht und jeweils 20 μ l der Lösung langsam in den Mikrokanal pipettiert. Um eine gleichmäßige Auskleidung des gesamten Kanals zu erreichen wurde der Chip daraufhin für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ mit einer Geschwindigkeit von 4 U/h gedreht. Anschließend wurde der Chip in eine aufrechte Position gebracht, die Anschlüsse mit Medium befüllt und die Zellen zur Regeneration 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ statisch inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Kanal mit 200 μ l hCMEC/D3-Kulturmedium gespült und an die Mikrofluidik angeschlossen.

Anschluss an die Mikrofluidik und Kultivierung

Vor dem Anschluss des Chips an die Mikrofluidik mussten zunächst alle zur Kultivierung verwendeten Schläuche und 10 ml Spritzen bereits am Vortrag mit Kulturmedium befüllt und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert werden, damit eine Luftblasenbildung in den Materialien aufgrund von Temperaturunterschieden verhindert werden konnte. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Schläuche auf das Vorhandensein von Luftblasen kontrolliert und diese gegebenenfalls entfernt. Anschließend wurden die Schläuche mit den Anschlüssen des PC-Mikrokanals verbunden und die Chips eine weitere Stunde statisch inkubiert bevor die Fluidik gestartet wurde. Für die Erzeugung der benötigten Flussraten von 100 µl/h wurde die Spritzenpumpe Fusion 200 (Chemyx) mit der Infusion Methode verwendet. Der Auslass des Kanals war dabei ebenfalls mit einem Schlauch verbunden, der in einen Abfallbehälter führte. Nach einer Kultivierungszeit von 48 h wurde das Kulturmedium gegen das hCMEC/D3-Differenzierungsmedium ausgetauscht. Alle zwei bis drei Tage wurde dieses dann in den Spritzen erneuert.

7 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	mikromolar
μs	Mikrosekunden
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Äq	Äquivalent
ASC	Adipöse mesenchymale Stammzelle
BBB	Blut-Hirn-Schranke (engl.: <i>blood brain barrier</i>)
br	breiter Peak im NMR
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAD	rechnerunterstütztes Konstruieren (engl.: <i>computer-aided design</i>)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag

D ₂ O	Deuterium Oxid, deuteriertes Wasser
Da	Dalton
ddH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i>)
DPBS ^{-/-}	Dulbecco`s Phosphate-Buffered Saline
E	Embryonalstadium
ECM	Extrazelluläre Matrix (engl.: <i>extracellular matrix</i>)
EDC-HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGM-2	Endothelial Cell Growth Medium-2
Em.	Emulsion
EthD-1	Ethidium-Homodimer 1
Ex.	Anregung (engl.: <i>excitation</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i>)
FDA	Fluorescein Diacetat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
G'	Speichermodul
G''	Verlustmodul
GelMA	Gelatinemethacrylamid
GelNB	Norborenen-funktionalisierte Gelatine

GeIS	Thiolierte Gelatine
Gly	Glycin
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HA	humane Astrozyten
hBVP	humane cerebrale vaskuläre Perizyten (engl.: <i>human brain vascular pericytes</i>)
HCl	Salzsäure
hCMEC/D3	humane cerebrale Endothelzellen
HepG2	humane Epithelzelllinie eines Leberkarzinoms
Hro	Hydroxyprolin
HUVEC	Humane Nabelschnurendothelzellen (engl.: <i>human umbilical vein endothelial cells</i>)
Hyl	L-hydroxylysin
IgG	Immunglobulin G
Irgacure D-2959	2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxyl)-2-methylpropiophenon
kDa	Kilodalton
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
L	Liter
LAP	Lithium-Phenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinate
LB	Nährmedium für Bakterien (engl.: <i>lysogeny broth</i>)
Lys	L-Lysin
M	Molar
MAA	Methacrylsäureanhydrid
m _{dry}	Trockengewicht
MES	Morpholinoethansulfonsäure

mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloprotease
MPa	Megapascal
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mW	Milliwatt
m _{wet}	Nassgewicht
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCA	5-Norbornen-2-carbonsäure
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NHDF	Normale humane Hautfibroblasten (<i>engl.: normal human dermal fibroblasts</i>)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanz (<i>engl.: nuclear magnetic resonance</i>)
p	Druck
PC	Polycarbonat
PDLA	D-Milchsäure (<i>engl.: poly-D-lactic acid</i>)
PI	Propidiumiodid
PLLA	L-Milchsäure (<i>engl.: poly-L-lactic acid</i>)
ppm	Parts per million

Pro	Prolin
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s	Singulett
TNBSA	Trinitrobenzolsulfonsäure (engl.: <i>trinitrobenzene sulfonic acid</i>)
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
δ	Delta, chemische Verschiebung
λ	Lambda, Wellenlänge

8 Literatur

- 1 Gordon, E. M., Barrett, R. W., Dower, W. J., Fodor, S. P. & Gallop, M. A. Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 2. Combinatorial organic synthesis, library screening strategies, and future directions. *J Med Chem* **37**, 1385-1401, doi:10.1021/jm00036a001 (1994).
- 2 Potyrailo, R. *et al.* Combinatorial and high-throughput screening of materials libraries: review of state of the art. *ACS Comb Sci* **13**, 579-633, doi:10.1021/co200007w (2011).
- 3 Schreiber, S. L. Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery. *Science* **287**, 1964-1969, doi:10.1126/science.287.5460.1964 (2000).
- 4 Ettlin, R. A. Toxicologic pathology in the 21st century. *Toxicol Pathol* **41**, 689-708, doi:10.1177/0192623312466192 (2013).
- 5 Hughes, J. P., Rees, S., Kalindjian, S. B. & Philpott, K. L. Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol* **162**, 1239-1249, doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x (2011).
- 6 Kamb, A., Wee, S. & Lengauer, C. Why is cancer drug discovery so difficult? *Nat Rev Drug Discov* **6**, 115-120, doi:10.1038/nrd2155 (2007).
- 7 Arrowsmith, J. Trial watch: phase III and submission failures: 2007-2010. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 87, doi:10.1038/nrd3375 (2011).
- 8 Hay, M., Thomas, D. W., Craighead, J. L., Economides, C. & Rosenthal, J. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotechnol* **32**, 40-51, doi:10.1038/nbt.2786 (2014).
- 9 Shanks, N., Greek, R. & Greek, J. Are animal models predictive for humans? *Philos Ethics Humanit Med* **4**, 2, doi:10.1186/1747-5341-4-2 (2009).
- 10 Olson, H. *et al.* Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol* **32**, 56-67, doi:10.1006/rtph.2000.1399 (2000).
- 11 Greek, J. & Shanks, N. Thoughts on animal models for human disease and treatment. *J Am Vet Med Assoc* **235**, 363; author reply 364, doi:10.2460/javma.235.4.363 (2009).
- 12 *European Commission* (2009).
- 13 Balls, M. Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. *Lab Anim* **28**, 193-211, doi:10.1258/002367794780681714 (1994).
- 14 Doke, S. K. & Dhawale, S. C. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharm J* **23**, 223-229, doi:10.1016/j.jsps.2013.11.002 (2015).
- 15 Langer, R. & Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science* **260**, 920-926, doi:10.1126/science.8493529 (1993).
- 16 Karp, J. M. & Langer, R. Development and therapeutic applications of advanced biomaterials. *Curr Opin Biotechnol* **18**, 454-459, doi:10.1016/j.copbio.2007.09.008 (2007).
- 17 Langer, R. & Tirrell, D. A. Designing materials for biology and medicine. *Nature* **428**, 487-492, doi:10.1038/nature02388 (2004).
- 18 Ivannikov, D. *In vitro Rekonstruktion verschiedener vaskulärer Barrieren*. (Cuvillier Verlag, 2016).

- 19 Kirk, R. G. W. Recovering The Principles of Humane Experimental Technique: The 3Rs and the Human Essence of Animal Research. *Sci Technol Human Values* **43**, 622-648, doi:10.1177/0162243917726579 (2018).
- 20 Breslin, S. & O'Driscoll, L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today* **18**, 240-249, doi:10.1016/j.drudis.2012.10.003 (2013).
- 21 Harrison, R. G. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *J Exp Zool* **142**, 5-73, doi:10.1002/jez.1401420103 (1959).
- 22 Bhatia, S. N. & Ingber, D. E. Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol* **32**, 760-772, doi:10.1038/nbt.2989 (2014).
- 23 Duval, K. *et al.* Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)* **32**, 266-277, doi:10.1152/physiol.00036.2016 (2017).
- 24 Kapalczynska, M. *et al.* 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci* **14**, 910-919, doi:10.5114/aoms.2016.63743 (2018).
- 25 Frantz, C., Stewart, K. M. & Weaver, V. M. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* **123**, 4195-4200, doi:10.1242/jcs.023820 (2010).
- 26 Marastoni, S., Ligresti, G., Lorenzon, E., Colombatti, A. & Mongiat, M. Extracellular matrix: a matter of life and death. *Connect Tissue Res* **49**, 203-206, doi:10.1080/03008200802143190 (2008).
- 27 Bissell, M. J., Rizki, A. & Mian, I. S. Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 753-762, doi:10.1016/j.ceb.2003.10.016 (2003).
- 28 Weaver, V. M. *et al.* Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol* **137**, 231-245, doi:10.1083/jcb.137.1.231 (1997).
- 29 Yue, B. Biology of the extracellular matrix: an overview. *J Glaucoma* **23**, S20-23, doi:10.1097/IJG.000000000000108 (2014).
- 30 Breslin, S. & O'Driscoll, L. The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Oncotarget* **7**, 45745-45756, doi:10.18632/oncotarget.9935 (2016).
- 31 Benya, P. D. & Shaffer, J. D. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* **30**, 215-224, doi:10.1016/0092-8674(82)90027-7 (1982).
- 32 Tibbitt, M. W. & Anseth, K. S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng* **103**, 655-663, doi:10.1002/bit.22361 (2009).
- 33 Greek, R. & Menache, A. Systematic reviews of animal models: methodology versus epistemology. *Int J Med Sci* **10**, 206-221, doi:10.7150/ijms.5529 (2013).
- 34 Debnath, J. & Brugge, J. S. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat Rev Cancer* **5**, 675-688, doi:10.1038/nrc1695 (2005).
- 35 Ehrmann, R. L. & Gey, G. O. The growth of cells on a transparent gel of reconstituted rat-tail collagen. *J Natl Cancer Inst* **16**, 1375-1403 (1956).
- 36 Froehlich, K. *et al.* Generation of Multicellular Breast Cancer Tumor Spheroids: Comparison of Different Protocols. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **21**, 89-98, doi:10.1007/s10911-016-9359-2 (2016).
- 37 Renner, M. *et al.* Self-organized developmental patterning and differentiation in cerebral organoids. *EMBO J* **36**, 1316-1329, doi:10.15252/embj.201694700 (2017).

- 38 Achilli, T. M., Meyer, J. & Morgan, J. R. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opin Biol Ther* **12**, 1347-1360, doi:10.1517/14712598.2012.707181 (2012).
- 39 Ahmed, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res* **6**, 105-121, doi:10.1016/j.jare.2013.07.006 (2015).
- 40 Hoffman, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* **54**, 3-12, doi:10.1016/s0169-409x(01)00239-3 (2002).
- 41 Cui, H., Nowicki, M., Fisher, J. P. & Zhang, L. G. 3D Bioprinting for Organ Regeneration. *Adv Healthc Mater* **6**, doi:10.1002/adhm.201601118 (2017).
- 42 Dababneh, A. B., Ozbolat, I.T. Bioprinting Technology: A Current State-of-the-Art Review. *Journal of Manufacturing Science and Engineering, Transactions of the ASME* **136**, doi:10.1115/1.4028512 (2014).
- 43 Malda, J. *et al.* 25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication. *Adv Mater* **25**, 5011-5028, doi:10.1002/adma.201302042 (2013).
- 44 Moroni, L. *et al.* Biofabrication strategies for 3D in vitro models and regenerative medicine. *Nat Rev Mater* **3**, 21-37, doi:10.1038/s41578-018-0006-y (2018).
- 45 Groll, J. *et al.* Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. *Biofabrication* **8**, 013001, doi:10.1088/1758-5090/8/1/013001 (2016).
- 46 Moroni, L. *et al.* Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology. *Trends Biotechnol* **36**, 384-402, doi:10.1016/j.tibtech.2017.10.015 (2018).
- 47 Dai, X. *et al.* Coaxial 3D bioprinting of self-assembled multicellular heterogeneous tumor fibers. *Sci Rep* **7**, 1457, doi:10.1038/s41598-017-01581-y (2017).
- 48 Lind, J. U. *et al.* Instrumented cardiac microphysiological devices via multimaterial three-dimensional printing. *Nat Mater* **16**, 303-308, doi:10.1038/nmat4782 (2017).
- 49 Mironov, V. *et al.* Biofabrication: a 21st century manufacturing paradigm. *Biofabrication* **1**, 022001, doi:10.1088/1758-5082/1/2/022001 (2009).
- 50 Mironov, V. Bioprinting: a beginning. *Tissue Engineering* **12**, doi:10.1089/ten.2006.12.631 (2006).
- 51 Kucukgul, C. *et al.* 3D bioprinting of biomimetic aortic vascular constructs with self-supporting cells. *Biotechnol Bioeng* **112**, 811-821, doi:10.1002/bit.25493 (2015).
- 52 Yoo, S. S. 3D-printed biological organs: medical potential and patenting opportunity. *Expert Opin Ther Pat* **25**, 507-511, doi:10.1517/13543776.2015.1019466 (2015).
- 53 Huh, D., Hamilton, G. A. & Ingber, D. E. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol* **21**, 745-754, doi:10.1016/j.tcb.2011.09.005 (2011).
- 54 Chang, R., Nam, J. & Sun, W. Direct cell writing of 3D microorgan for in vitro pharmacokinetic model. *Tissue Eng Part C Methods* **14**, 157-166, doi:10.1089/ten.tec.2007.0392 (2008).
- 55 Peng, W. *et al.* 3D bioprinting for drug discovery and development in pharmaceuticals. *Acta Biomater* **57**, 26-46, doi:10.1016/j.actbio.2017.05.025 (2017).
- 56 Satpathy, A. *et al.* Developments with 3D bioprinting for novel drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* **13**, 1115-1129, doi:10.1080/17460441.2018.1542427 (2018).
- 57 Koch, L., Gruene, M., Unger, C. & Chichkov, B. Laser assisted cell printing. *Curr Pharm Biotechnol* **14**, 91-97 (2013).
- 58 Guillotin, B. & Guillemot, F. Cell patterning technologies for organotypic tissue fabrication. *Trends Biotechnol* **29**, 183-190, doi:10.1016/j.tibtech.2010.12.008 (2011).
- 59 Guillotin, B. *et al.* Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. *Biomaterials* **31**, 7250-7256, doi:10.1016/j.biomaterials.2010.05.055 (2010).

- 60 Boland, T., Xu, T., Damon, B. & Cui, X. Application of inkjet printing to tissue engineering. *Biotechnol J* **1**, 910-917, doi:10.1002/biot.200600081 (2006).
- 61 de Jong, J., de Bruin, G. Air entrapment in piezo-driven inkjet printheads *The Journal of the Acoustical Society of America* **120** (2006).
- 62 Cui, X., Boland, T., D'Lima, D. D. & Lotz, M. K. Thermal inkjet printing in tissue engineering and regenerative medicine. *Recent Pat Drug Deliv Formul* **6**, 149-155, doi:10.2174/187221112800672949 (2012).
- 63 Calvert, P. Materials science. Printing cells. *Science* **318**, 208-209, doi:10.1126/science.1144212 (2007).
- 64 Calvert, P. Inkjet Printing for Materials and Devices. *Chemistry of Materials* **13** (2001).
- 65 Moon, S. *et al.* Layer by layer three-dimensional tissue epitaxy by cell-laden hydrogel droplets. *Tissue Eng Part C Methods* **16**, 157-166, doi:10.1089/ten.TEC.2009.0179 (2010).
- 66 Ozbolat, I. T. & Yu, Y. Bioprinting toward organ fabrication: challenges and future trends. *IEEE Trans Biomed Eng* **60**, 691-699, doi:10.1109/TBME.2013.2243912 (2013).
- 67 Wang, X. *et al.* Generation of three-dimensional hepatocyte/gelatin structures with rapid prototyping system. *Tissue Eng* **12**, 83-90, doi:10.1089/ten.2006.12.83 (2006).
- 68 Wang, X. & Liu, C. 3D Bioprinting of Adipose-Derived Stem Cells for Organ Manufacturing. *Adv Exp Med Biol* **1078**, 3-14, doi:10.1007/978-981-13-0950-2_1 (2018).
- 69 Chen, Q. *et al.* An Interpenetrating Alginate/Gelatin Network for Three-Dimensional (3D) Cell Cultures and Organ Bioprinting. *Molecules* **25**, doi:10.3390/molecules25030756 (2020).
- 70 Derby, B. Printing and prototyping of tissues and scaffolds. *Science* **338**, 921-926, doi:10.1126/science.1226340 (2012).
- 71 Ferris, C. J., Gilmore, K. G., Wallace, G. G. & In het Panhuis, M. Biofabrication: an overview of the approaches used for printing of living cells. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 4243-4258, doi:10.1007/s00253-013-4853-6 (2013).
- 72 You, F., Eames, B. F. & Chen, X. Application of Extrusion-Based Hydrogel Bioprinting for Cartilage Tissue Engineering. *Int J Mol Sci* **18**, doi:10.3390/ijms18071597 (2017).
- 73 Chung, J. H., Naficy, S. Yue, Z. Kapsa, R. Quigley, A., Moulton, S.E., Wallace, G.G. Bio-ink properties and printability for extrusion printing living cells. *Biomaterials Science* (2013).
- 74 Gungor-Ozkerim, P. S., Inci, I., Zhang, Y. S., Khademhosseini, A. & Dokmeci, M. R. Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomater Sci* **6**, 915-946, doi:10.1039/c7bm00765e (2018).
- 75 Lee, H. J. *et al.* A New Approach for Fabricating Collagen/ECM-Based Bioinks Using Preosteoblasts and Human Adipose Stem Cells. *Adv Healthc Mater* **4**, 1359-1368, doi:10.1002/adhm.201500193 (2015).
- 76 Drury, J. L. & Mooney, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* **24**, 4337-4351, doi:10.1016/s0142-9612(03)00340-5 (2003).
- 77 Burg, K. J., Porter, S. & Kellam, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* **21**, 2347-2359, doi:10.1016/s0142-9612(00)00102-2 (2000).
- 78 Ogneva, I. V. Cell mechanosensitivity: mechanical properties and interaction with gravitational field. *Biomed Res Int* **2013**, 598461, doi:10.1155/2013/598461 (2013).

- 79 Discher, D. E., Janmey, P. & Wang, Y. L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* **310**, 1139-1143, doi:10.1126/science.1116995 (2005).
- 80 Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. & Discher, D. E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **126**, 677-689, doi:10.1016/j.cell.2006.06.044 (2006).
- 81 Slaughter, B. V., Khurshid, S. S., Fisher, O. Z., Khademhosseini, A. & Peppas, N. A. Hydrogels in regenerative medicine. *Adv Mater* **21**, 3307-3329, doi:10.1002/adma.200802106 (2009).
- 82 Mantha, S. *et al.* Smart Hydrogels in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Materials (Basel)* **12**, doi:10.3390/ma12203323 (2019).
- 83 Peppas, N. A. H., J.Z., Khademhosseini, A., Langer, R. Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. *Advanced Materials* **18**, 1345-1360 (2006).
- 84 Chan, B. P. & Leong, K. W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J* **17 Suppl 4**, 467-479, doi:10.1007/s00586-008-0745-3 (2008).
- 85 Benoit, D. S., Durney, A. R. & Anseth, K. S. Manipulations in hydrogel degradation behavior enhance osteoblast function and mineralized tissue formation. *Tissue Eng* **12**, 1663-1673, doi:10.1089/ten.2006.12.1663 (2006).
- 86 Roberts, J. J., Nicodemus, G. D., Greenwald, E. C. & Bryant, S. J. Degradation improves tissue formation in (un)loaded chondrocyte-laden hydrogels. *Clin Orthop Relat Res* **469**, 2725-2734, doi:10.1007/s11999-011-1823-0 (2011).
- 87 Weber, L. M., Hayda, K. N. & Anseth, K. S. Cell-matrix interactions improve beta-cell survival and insulin secretion in three-dimensional culture. *Tissue Eng Part A* **14**, 1959-1968, doi:10.1089/ten.tea.2007.0238 (2008).
- 88 Loo, Y. *et al.* Peptide Bioink: Self-Assembling Nanofibrous Scaffolds for Three-Dimensional Organotypic Cultures. *Nano Lett* **15**, 6919-6925, doi:10.1021/acs.nanolett.5b02859 (2015).
- 89 Zhu, M., Wang, Y. Ferracci, G. Zheng, J., Cho, N.J. Gelatin methacryloyl and its hydrogels with an exceptional degree of controllability and batch-to-batch consistency. *Scientific Reports* **9**, doi:10.1038/s41598-019-42186-x (2019).
- 90 Hospodiuk, M., Dey, M., Sosnoski, D. & Ozbolat, I. T. The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. *Biotechnol Adv* **35**, 217-239, doi:10.1016/j.biotechadv.2016.12.006 (2017).
- 91 Unagolla, J. M. & Jayasuriya, A. C. Hydrogel-based 3D bioprinting: A comprehensive review on cell-laden hydrogels, bioink formulations, and future perspectives. *Appl Mater Today* **18**, doi:10.1016/j.apmt.2019.100479 (2020).
- 92 El-Sherbiny, I. M. & Yacoub, M. H. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Glob Cardiol Sci Pract* **2013**, 316-342, doi:10.5339/gcsp.2013.38 (2013).
- 93 Annabi, N. *et al.* Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* **16**, 371-383, doi:10.1089/ten.TEB.2009.0639 (2010).
- 94 Ruedinger, F., Lavrentieva, A., Blume, C., Pepelanova, I. & Scheper, T. Hydrogels for 3D mammalian cell culture: a starting guide for laboratory practice. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**, 623-636, doi:10.1007/s00253-014-6253-y (2015).

- 95 Geckil, H., Xu, F., Zhang, X., Moon, S. & Demirci, U. Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Nanomedicine (Lond)* **5**, 469-484, doi:10.2217/nnm.10.12 (2010).
- 96 Nie, S., Hsiao, W. L., Pan, W. & Yang, Z. Thermoreversible Pluronic F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: in vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies. *Int J Nanomedicine* **6**, 151-166, doi:10.2147/IJN.S15057 (2011).
- 97 White, C. J., McBride, M. K., Pate, K. M., Tieppo, A. & Byrne, M. E. Extended release of high molecular weight hydroxypropyl methylcellulose from molecularly imprinted, extended wear silicone hydrogel contact lenses. *Biomaterials* **32**, 5698-5705, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.04.044 (2011).
- 98 E.A. Kamoun, E.-R. S. K., T.M. Tamer, M.A. El-Meligy and M.S. Mohy Eldin. Poly (vinyl alcohol)-alginate physically crosslinked hydrogel membranes for wound dressing applications: characterization and bio-evaluation. *Arab. J. Chem.* **8**, 38-47 (2015).
- 99 Zhu, J. & Marchant, R. E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices* **8**, 607-626, doi:10.1586/erd.11.27 (2011).
- 100 Thomas, B. H., Craig Fryman, J., Liu, K. & Mason, J. Hydrophilic-hydrophobic hydrogels for cartilage replacement. *J Mech Behav Biomed Mater* **2**, 588-595, doi:10.1016/j.jmbbm.2008.08.001 (2009).
- 101 Yamamoto, M. *et al.* Generation of stable co-cultures of vascular cells in a honeycomb alginate scaffold. *Tissue Eng Part A* **16**, 299-308, doi:10.1089/ten.TEA.2009.0010 (2010).
- 102 Rajan, N., Habermehl, J., Cote, M. F., Doillon, C. J. & Mantovani, D. Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. *Nat Protoc* **1**, 2753-2758, doi:10.1038/nprot.2006.430 (2006).
- 103 Ye, Q. *et al.* Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg* **17**, 587-591, doi:10.1016/s1010-7940(00)00373-0 (2000).
- 104 Smith, C. M. *et al.* Three-dimensional bioassembly tool for generating viable tissue-engineered constructs. *Tissue Eng* **10**, 1566-1576, doi:10.1089/ten.2004.10.1566 (2004).
- 105 Gasperini, L., Mano, J. F. & Reis, R. L. Natural polymers for the microencapsulation of cells. *J R Soc Interface* **11**, 20140817, doi:10.1098/rsif.2014.0817 (2014).
- 106 Lee, K. Y. & Mooney, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci* **37**, 106-126, doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003 (2012).
- 107 Hersel, U., Dahmen, C. & Kessler, H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* **24**, 4385-4415, doi:10.1016/s0142-9612(03)00343-0 (2003).
- 108 Luzak, B., Golanski, J., Rozalski, M., Boncler, M. A. & Watala, C. Inhibition of collagen-induced platelet reactivity by DGEA peptide. *Acta Biochim Pol* **50**, 1119-1128, doi:0350041119 (2003).
- 109 Davidenko, N. *et al.* Evaluation of cell binding to collagen and gelatin: a study of the effect of 2D and 3D architecture and surface chemistry. *J Mater Sci Mater Med* **27**, 148, doi:10.1007/s10856-016-5763-9 (2016).

- 110 Berkovitch, Y. & Seliktar, D. Semi-synthetic hydrogel composition and stiffness regulate neuronal morphogenesis. *Int J Pharm* **523**, 545-555, doi:10.1016/j.ijpharm.2016.11.032 (2017).
- 111 Anjum, F., Carroll, A., Young, S. A., Flynn, L. E. & Amsden, B. G. Tough, Semisynthetic Hydrogels for Adipose Derived Stem Cell Delivery for Chondral Defect Repair. *Macromol Biosci* **17**, doi:10.1002/mabi.201600373 (2017).
- 112 Van Den Bulcke, A. I. *et al.* Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. *Biomacromolecules* **1**, 31-38, doi:10.1021/bm990017d (2000).
- 113 Nichol, J. W. *et al.* Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials* **31**, 5536-5544, doi:10.1016/j.biomaterials.2010.03.064 (2010).
- 114 Loessner, D. *et al.* Functionalization, preparation and use of cell-laden gelatin methacryloyl-based hydrogels as modular tissue culture platforms. *Nat Protoc* **11**, 727-746, doi:10.1038/nprot.2016.037 (2016).
- 115 Chang, C. C., Boland, E. D., Williams, S. K. & Hoying, J. B. Direct-write bioprinting three-dimensional biohybrid systems for future regenerative therapies. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **98**, 160-170, doi:10.1002/jbm.b.31831 (2011).
- 116 Parhi, R. Cross-Linked Hydrogel for Pharmaceutical Applications: A Review. *Adv Pharm Bull* **7**, 515-530, doi:10.15171/apb.2017.064 (2017).
- 117 Sun, J. & Tan, H. Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials (Basel)* **6**, 1285-1309, doi:10.3390/ma6041285 (2013).
- 118 Bruchet, M. & Melman, A. Fabrication of patterned calcium cross-linked alginate hydrogel films and coatings through reductive cation exchange. *Carbohydr Polym* **131**, 57-64, doi:10.1016/j.carbpol.2015.05.021 (2015).
- 119 Biela, T., Duda, A., Penczek, S. Enhanced Melt Stability of Star-Shaped Stereocomplexes As Compared with Linear Stereocomplexes. *Macromolecules* **39**, 3710-3713 (2006).
- 120 Campiglio, C. E., Contessi Negrini, N., Fare, S. & Draghi, L. Cross-Linking Strategies for Electrospun Gelatin Scaffolds. *Materials (Basel)* **12**, doi:10.3390/ma12152476 (2019).
- 121 Akagi, T., Fujiwara, T. & Akashi, M. Rapid fabrication of polylactide stereocomplex using layer-by-layer deposition by inkjet printing. *Angew Chem Int Ed Engl* **51**, 5493-5496, doi:10.1002/anie.201201586 (2012).
- 122 Srisuwan, Y. & Baimark, Y. Mechanical properties and heat resistance of stereocomplex polylactide/copolyester blend films prepared by in situ melt blending followed with compression molding. *Heliyon* **4**, e01082, doi:10.1016/j.heliyon.2018.e01082 (2018).
- 123 Van Tomme, S. R. & Hennink, W. E. Biodegradable dextran hydrogels for protein delivery applications. *Expert Rev Med Devices* **4**, 147-164, doi:10.1586/17434440.4.2.147 (2007).
- 124 Liu, K. Y., Abebe, D. G., Wiley, E. R. & Fujiwara, T. Characterization and Optimization of PLA Stereocomplexed Hydrogels for Local Gene Delivery Systems. *Polymers (Basel)* **11**, doi:10.3390/polym11050796 (2019).
- 125 Hiemstra, C., Zhong, Z., Li, L., Dijkstra, P. J. & Feijen, J. In-situ formation of biodegradable hydrogels by stereocomplexation of PEG-(PLLA)₈ and PEG-(PDLA)₈ star block copolymers. *Biomacromolecules* **7**, 2790-2795, doi:10.1021/bm060630e (2006).

- 126 Hennink, W. E., De Jong, S. J., Bos, G. W., Veldhuis, T. F. & van Nostrum, C. F. Biodegradable dextran hydrogels crosslinked by stereocomplex formation for the controlled release of pharmaceutical proteins. *Int J Pharm* **277**, 99-104, doi:10.1016/j.ijpharm.2003.02.002 (2004).
- 127 de Jong, S. J., van Eerdenbrugh, B., van Nostrum, C. F., Kettenes-van den Bosch, J. J. & Hennink, W. E. Physically crosslinked dextran hydrogels by stereocomplex formation of lactic acid oligomers: degradation and protein release behavior. *J Control Release* **71**, 261-275, doi:10.1016/s0168-3659(01)00228-0 (2001).
- 128 Bigi, A., Panzavolta, S. & Rubini, K. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials* **25**, 5675-5680, doi:10.1016/j.biomaterials.2004.01.033 (2004).
- 129 Shoulders, M. D. & Raines, R. T. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* **78**, 929-958, doi:10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833 (2009).
- 130 Qiao, C., Zhang, J., Ma, X., Liu, W. & Liu, Q. Effect of salt on the coil-helix transition of gelatin at early stages: Optical rotation, rheology and DSC studies. *Int J Biol Macromol* **107**, 1074-1079, doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.09.079 (2018).
- 131 Catoira, M. C., Fusaro, L., Di Francesco, D., Ramella, M. & Boccafoschi, F. Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *J Mater Sci Mater Med* **30**, 115, doi:10.1007/s10856-019-6318-7 (2019).
- 132 Lv, X., Liu, C., Shao, Z. & Sun, S. Tuning Physical Crosslinks in Hybrid Hydrogels for Network Structure Analysis and Mechanical Reinforcement. *Polymers (Basel)* **11**, doi:10.3390/polym11020352 (2019).
- 133 Dragan, E. S. Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. A review. *Chemical Engineering Journal* **243**, 572-590 (2014).
- 134 Wang, Z. *et al.* A simple and high-resolution stereolithography-based 3D bioprinting system using visible light crosslinkable bioinks. *Biofabrication* **7**, 045009, doi:10.1088/1758-5090/7/4/045009 (2015).
- 135 Hennink, W. E. & van Nostrum, C. F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev* **54**, 13-36, doi:10.1016/s0169-409x(01)00240-x (2002).
- 136 Li, J. & Mooney, D. J. Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nat Rev Mater* **1**, doi:10.1038/natrevmats.2016.71 (2016).
- 137 Lin, C. C. & Metters, A. T. Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. *Adv Drug Deliv Rev* **58**, 1379-1408, doi:10.1016/j.addr.2006.09.004 (2006).
- 138 Ehrbar, M. *et al.* Elucidating the role of matrix stiffness in 3D cell migration and remodeling. *Biophys J* **100**, 284-293, doi:10.1016/j.bpj.2010.11.082 (2011).
- 139 Ye, Q., Wang, Y., Williams, K. & Spencer, P. Characterization of photopolymerization of dentin adhesives as a function of light source and irradiance. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **80**, 440-446, doi:10.1002/jbm.b.30615 (2007).
- 140 Nguyen, K. T. & West, J. L. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials* **23**, 4307-4314, doi:10.1016/s0142-9612(02)00175-8 (2002).
- 141 Choi, G. & Cha, H. J. Recent advances in the development of nature-derived photocrosslinkable biomaterials for 3D printing in tissue engineering. *Biomater Res* **23**, 18, doi:10.1186/s40824-019-0168-8 (2019).
- 142 Nguyen, M. K., McMillan, A., Huynh, C. T., Schapira, D. S. & Alsberg, E. Photocrosslinkable, biodegradable hydrogels with controlled cell adhesivity for

- prolonged siRNA delivery to hMSCs to enhance their osteogenic differentiation. *J Mater Chem B* **5**, 485-495, doi:10.1039/C6TB01739H (2017).
- 143 Nettles, D. L., Vail, T. P., Morgan, M. T., Grinstaff, M. W. & Setton, L. A. Photocrosslinkable hyaluronan as a scaffold for articular cartilage repair. *Ann Biomed Eng* **32**, 391-397, doi:10.1023/b:abme.0000017552.65260.94 (2004).
- 144 Dai, X. *et al.* Free radical polymerization of poly(ethylene glycol) diacrylate macromers: impact of macromer hydrophobicity and initiator chemistry on polymerization efficiency. *Acta Biomater* **7**, 1965-1972, doi:10.1016/j.actbio.2011.01.005 (2011).
- 145 Mironi-Harpaz, I., Wang, D. Y., Venkatraman, S. & Seliktar, D. Photopolymerization of cell-encapsulating hydrogels: crosslinking efficiency versus cytotoxicity. *Acta Biomater* **8**, 1838-1848, doi:10.1016/j.actbio.2011.12.034 (2012).
- 146 Shin, H., Olsen, B. D. & Khademhosseini, A. The mechanical properties and cytotoxicity of cell-laden double-network hydrogels based on photocrosslinkable gelatin and gellan gum biomacromolecules. *Biomaterials* **33**, 3143-3152, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.12.050 (2012).
- 147 Wilson, D. I. What is rheology? *Eye (Lond)* **32**, 179-183, doi:10.1038/eye.2017.267 (2018).
- 148 Diamantides, N. *et al.* Correlating rheological properties and printability of collagen bioinks: the effects of riboflavin photocrosslinking and pH. *Biofabrication* **9**, 034102, doi:10.1088/1758-5090/aa780f (2017).
- 149 Symon, K. R. *Mechanics*. (Addison-Wesley Publishing Company, 1971).
- 150 He, Y. *et al.* Research on the printability of hydrogels in 3D bioprinting. *Sci Rep* **6**, 29977, doi:10.1038/srep29977 (2016).
- 151 Schuurman, W. *et al.* Gelatin-methacrylamide hydrogels as potential biomaterials for fabrication of tissue-engineered cartilage constructs. *Macromol Biosci* **13**, 551-561, doi:10.1002/mabi.201200471 (2013).
- 152 Nicodemus, G. D. & Bryant, S. J. Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev* **14**, 149-165, doi:10.1089/ten.teb.2007.0332 (2008).
- 153 Rezende, R. A., Bartolo, P.J., Mendes, A., Filho, R.M. Rheological behavior of alginate solutions for biomanufacturing. *Journal of Applied Polymer Science* **113**, 3866-3871 (2009).
- 154 Skardal, A. *et al.* Photocrosslinkable hyaluronan-gelatin hydrogels for two-step bioprinting. *Tissue Eng Part A* **16**, 2675-2685, doi:10.1089/ten.TEA.2009.0798 (2010).
- 155 Aguado, B. A., Mulyasmita, W., Su, J., Lampe, K. J. & Heilshorn, S. C. Improving viability of stem cells during syringe needle flow through the design of hydrogel cell carriers. *Tissue Eng Part A* **18**, 806-815, doi:10.1089/ten.TEA.2011.0391 (2012).
- 156 Fedorovich, N. E. *et al.* Biofabrication of osteochondral tissue equivalents by printing topologically defined, cell-laden hydrogel scaffolds. *Tissue Eng Part C Methods* **18**, 33-44, doi:10.1089/ten.TEC.2011.0060 (2012).
- 157 Townsend, J. M., Beck, E. C., Gehrke, S. H., Berkland, C. J. & Detamore, M. S. Flow Behavior Prior to Crosslinking: The Need for Precursor Rheology for Placement of Hydrogels in Medical Applications and for 3D Bioprinting. *Prog Polym Sci* **91**, 126-140, doi:10.1016/j.progpolymsci.2019.01.003 (2019).

- 158 Varchanis, S. *et al.* Transition between solid and liquid state of yield-stress fluids under purely extensional deformations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 12611-12617, doi:10.1073/pnas.1922242117 (2020).
- 159 Chaparian, E., Izbassarov, D., De Vita, F., Brandt, L. & Tammisola, O. Yield-stress fluids in porous media: a comparison of viscoplastic and elastoviscoplastic flows. *Meccanica* **55**, 331-342, doi:10.1007/s11012-019-01010-6 (2020).
- 160 Guvendiren, M., Lu, H.D., Burdick, J.A. Shear-thinning hydrogels for biomedical applications *Soft Matter* **8**, 260-272 (2012).
- 161 Chen, M. H. *et al.* Methods To Assess Shear-Thinning Hydrogels for Application As Injectable Biomaterials. *ACS Biomater Sci Eng* **3**, 3146-3160, doi:10.1021/acsbiomaterials.7b00734 (2017).
- 162 Jalalvandi, E. & Shavandi, A. Shear thinning/self-healing hydrogel based on natural polymers with secondary photocrosslinking for biomedical applications. *J Mech Behav Biomed Mater* **90**, 191-201, doi:10.1016/j.jmbbm.2018.10.009 (2019).
- 163 Kappings, V. *Tumormodelle in vitro: von 2D-Zellkulturen zum durchbluteten Organ-on-a-chip System*, Karlsruher Institut für Technologie, (2017).
- 164 Esch, E. W., Bahinski, A. & Huh, D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 248-260, doi:10.1038/nrd4539 (2015).
- 165 Yum, K., Hong, S. G., Healy, K. E. & Lee, L. P. Physiologically relevant organs on chips. *Biotechnol J* **9**, 16-27, doi:10.1002/biot.201300187 (2014).
- 166 Huh, D., Torisawa, Y. S., Hamilton, G. A., Kim, H. J. & Ingber, D. E. Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips. *Lab Chip* **12**, 2156-2164, doi:10.1039/c2lc40089h (2012).
- 167 Konar, D., Devarasetty, M., Yildiz, D. V., Atala, A. & Murphy, S. V. Lung-On-A-Chip Technologies for Disease Modeling and Drug Development. *Biomed Eng Comput Biol* **7**, 17-27, doi:10.4137/BECB.S34252 (2016).
- 168 Chang, S. Y., Weber, E. J., Ness, K. V., Eaton, D. L. & Kelly, E. J. Liver and Kidney on Chips: Microphysiological Models to Understand Transporter Function. *Clin Pharmacol Ther* **100**, 464-478, doi:10.1002/cpt.436 (2016).
- 169 Ugolini, G. S., Visone, R., Cruz-Moreira, D., Redaelli, A. & Rasponi, M. Tailoring cardiac environment in microphysiological systems: an outlook on current and perspective heart-on-chip platforms. *Future Sci OA* **3**, FSO191, doi:10.4155/foa-2017-0024 (2017).
- 170 Ugolini, G. S., Visone, R., Cruz-Moreira, D., Mainardi, A. & Rasponi, M. Generation of functional cardiac microtissues in a beating heart-on-a-chip. *Methods Cell Biol* **146**, 69-84, doi:10.1016/bs.mcb.2018.05.005 (2018).
- 171 Borenstein, J. T. Organs-on-Chips: How Microsystems Technology Can Transform the Drug Development Process. *IEEE Pulse* **7**, 22-26, doi:10.1109/MPUL.2015.2513722 (2016).
- 172 Low, L. A. & Tagle, D. A. Microphysiological Systems (Tissue Chips) and their Utility for Rare Disease Research. *Adv Exp Med Biol* **1031**, 405-415, doi:10.1007/978-3-319-67144-4_23 (2017).
- 173 Fernandez, C. E. *et al.* Human Vascular Microphysiological System for in vitro Drug Screening. *Sci Rep* **6**, 21579, doi:10.1038/srep21579 (2016).
- 174 Pasqualini, F. S., Emmert, M. Y., Parker, K. K. & Hoerstrup, S. P. Organ Chips: Quality Assurance Systems in Regenerative Medicine. *Clin Pharmacol Ther* **101**, 31-34, doi:10.1002/cpt.527 (2017).

- 175 Upadhyay, R. K. Transendothelial Transport and Its Role in Therapeutics. *Int Sch Res Notices* **2014**, 309404, doi:10.1155/2014/309404 (2014).
- 176 Polini, A. *et al.* Organs-on-a-chip: a new tool for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* **9**, 335-352, doi:10.1517/17460441.2014.886562 (2014).
- 177 Kappings, V., Grün, C. Ivannikov, D., Hebeiss, I., Kattge, S., Wendland, I., Rapp, B.E., Hettel, M., Deutschmann, O., Schepers, U. vasQchip: A Novel Microfluidic, Artificial Blood Vessel Scaffold for Vascularized 3D Tissues. *Advanced Materials Technologies* **3**, doi:10.1002/admt.201700246 (2018).
- 178 Grün, C. P., R., Haase, S., Schepers, U. Durchblutete Organe auf dem Chip. *GIT Labor-Fachzeitschrift* **2/2018** (2018).
- 179 Yi, H. G., Lee, H. & Cho, D. W. 3D Printing of Organs-On-Chips. *Bioengineering (Basel)* **4**, doi:10.3390/bioengineering4010010 (2017).
- 180 Mi, S., Du, Z., Xu, Y. & Sun, W. The crossing and integration between microfluidic technology and 3D printing for organ-on-chips. *J Mater Chem B* **6**, 6191-6206, doi:10.1039/c8tb01661e (2018).
- 181 Knowlton, S. *et al.* 3D-printed microfluidic chips with patterned, cell-laden hydrogel constructs. *Biofabrication* **8**, 025019, doi:10.1088/1758-5090/8/2/025019 (2016).
- 182 Thiele, J., Ma, Y., Bruekers, S. M., Ma, S. & Huck, W. T. 25th anniversary article: Designer hydrogels for cell cultures: a materials selection guide. *Adv Mater* **26**, 125-147, doi:10.1002/adma.201302958 (2014).
- 183 Nuttelman, C. R. *et al.* Macromolecular Monomers for the Synthesis of Hydrogel Niches and Their Application in Cell Encapsulation and Tissue Engineering. *Prog Polym Sci* **33**, 167-179, doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.09.006 (2008).
- 184 Panwar, A. & Tan, L. P. Current Status of Biopinks for Micro-Extrusion-Based 3D Bioprinting. *Molecules* **21**, doi:10.3390/molecules21060685 (2016).
- 185 Hubbell, J. A. Bioactive biomaterials. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 123-129, doi:10.1016/s0958-1669(99)80021-4 (1999).
- 186 Göckler, T. *Chemisch-biologisches Design von Biomaterialien und Biotinten für lichtbasierte Biofabrikationsprozesse im Tissue Engineering*, Karlsruher Institut für Technologie, (2020).
- 187 Kempter, X. *Synthese und Charakterisierung photopolymerisierbarer Hydrogele auf Gelatinebasis* Master thesis, Karlsruher Institut für Technologie, (2018).
- 188 Schrieber, R., Gareis, H. . *Gelatin Handbook: Theory and Industrial Practice*. (2007).
- 189 Kempka, A. P., Souza. Influence of bloom number and plastifiers on gelatin matrices produced for enzyme immobilization. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **31**, 95-108, doi:10.1590/S0104-66322014000100010 (2014).
- 190 Francis, F. J. *Encyclopedia of food science and technology* (Wiley, 2000).
- 191 Bertassoni, L. E. *et al.* Direct-write bioprinting of cell-laden methacrylated gelatin hydrogels. *Biofabrication* **6**, 024105, doi:10.1088/1758-5082/6/2/024105 (2014).
- 192 Fratzl, P. *Collagen: Structure and Mechanics*. (Springer, 2008).
- 193 Scientific, T. F. User Guide: TNBSA.
- 194 Kale, R. & Bajaj, A. Ultraviolet spectrophotometric method for determination of gelatin crosslinking in the presence of amino groups. *J Young Pharm* **2**, 90-94, doi:10.4103/0975-1483.62223 (2010).
- 195 Barczyk, M., Carracedo, S. & Gullberg, D. Integrins. *Cell Tissue Res* **339**, 269-280, doi:10.1007/s00441-009-0834-6 (2010).

- 196 Loh, L. C., Locke, D., Melnychuk, R. & Lafert. The RGD sequence in the cytomegalovirus DNA polymerase accessory protein can mediate cell adhesion. *Virology* **272**, 302-314, doi:10.1006/viro.2000.0366 (2000).
- 197 Burdick, J. A., Peterson, A. J. & Anseth, K. S. Conversion and temperature profiles during the photoinitiated polymerization of thick orthopaedic biomaterials. *Biomaterials* **22**, 1779-1786, doi:10.1016/s0142-9612(00)00347-1 (2001).
- 198 Göckler, T., Haase, S., Kempter, X., Pfister, R., Maciel, B.R., Grimm, A., Willenbacher, N., Schepers, U. . Tuning Thiol-Norbornene Functionalized Gelatin Hydrogels for 3D Bioprinting. *Biomaterials* (2020).
- 199 Morgan, C. R., Magnotta, F., Ketley A.D. Thiol/ene photocurable polymers. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition* **15**, 627-645, doi:10.1002/pol.1977.170150311 (1977).
- 200 Munoz, Z., Shih, H. & Lin, C. C. Gelatin hydrogels formed by orthogonal thiol-norbornene photochemistry for cell encapsulation. *Biomater Sci* **2**, 1063-1072, doi:10.1039/c4bm00070f (2014).
- 201 Scientific, T. F. *Thermo Scientific Technical Handbook "Easy Molecular Bonding - Crosslinking Technology"*.
- 202 Tytgat, L. *et al.* Additive manufacturing of photo-crosslinked gelatin scaffolds for adipose tissue engineering. *Acta Biomater* **94**, 340-350, doi:10.1016/j.actbio.2019.05.062 (2019).
- 203 Galvao, J. *et al.* Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J* **28**, 1317-1330, doi:10.1096/fj.13-235440 (2014).
- 204 Yi, X. *et al.* Toxic effects of dimethyl sulfoxide on red blood cells, platelets, and vascular endothelial cells in vitro. *FEBS Open Bio* **7**, 485-494, doi:10.1002/2211-5463.12193 (2017).
- 205 Van Vlierberghe, S., Dubruel, P. & Schacht, E. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review. *Biomacromolecules* **12**, 1387-1408, doi:10.1021/bm200083n (2011).
- 206 Gyarmati, B., Nemethy, A., Szilagy, A. . Reversible disulphide formation in polymer networks: A versatile functional group from synthesis to applications. *European Polymer Journal* **49**, 1268-1286 (2013).
- 207 Van Vlierberghe, S., Schacht, E., Dubruel, P. Reversible gelatin-based hydrogels: Finetuning of material properties. *European Polymer Journal* **47**, 1039-1047 (2011).
- 208 Fairbanks, B. D., Schwartz, M. P., Bowman, C. N. & Anseth, K. S. Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility. *Biomaterials* **30**, 6702-6707, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.08.055 (2009).
- 209 Pfister, R. *In vitro Rekonstruktion der neurovaskulären Einheit auf dem Chip*, Karlsruher Institut für Technologie, (2020).
- 210 Bryant, S. J., Nuttelman, C. R. & Anseth, K. S. Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts in vitro. *J Biomater Sci Polym Ed* **11**, 439-457, doi:10.1163/156856200743805 (2000).
- 211 Grimm, A. *Optimierung gelatinebasierter Hydrogele*, Karlsruher Institut für Technologie, (2018).
- 212 Promega. CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Technical Bulletin.
- 213 Williams, C. G., Malik, A. N., Kim, T. K., Manson, P. N. & Elisseeff, J. H. Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels

- and cell encapsulation. *Biomaterials* **26**, 1211-1218, doi:10.1016/j.biomaterials.2004.04.024 (2005).
- 214 Kehrer, J. P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* **23**, 21-48, doi:10.3109/10408449309104073 (1993).
- 215 Neumann, K. H. *Pflanzliche Zell- und Gewebekulturen*. (Ulmer, 1995).
- 216 Feser, D. *Untersuchung der Eignung von peptoidbasierten Crosslinkern für Hydrogele in der 3D-Zellkultur* Karlsruher Institut für Technologie, (2019).
- 217 Held, K. D. & Melder, D. C. Toxicity of the sulfhydryl-containing radioprotector dithiothreitol. *Radiat Res* **112**, 544-554 (1987).
- 218 Munday, R. Toxicity of thiols and disulphides: involvement of free-radical species. *Free Radic Biol Med* **7**, 659-673, doi:10.1016/0891-5849(89)90147-0 (1989).
- 219 Held, K. D., Sylvester, F. C., Hopcia, K. L. & Biaglow, J. E. Role of Fenton chemistry in thiol-induced toxicity and apoptosis. *Radiat Res* **145**, 542-553 (1996).
- 220 Masuma, R., Kashima, S., Kurasaki, M. & Okuno, T. Effects of UV wavelength on cell damages caused by UV irradiation in PC12 cells. *J Photochem Photobiol B* **125**, 202-208, doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.06.003 (2013).
- 221 Mallet, J. D. & Rochette, P. J. Ultraviolet light-induced cyclobutane pyrimidine dimers in rabbit eyes. *Photochem Photobiol* **87**, 1363-1368, doi:10.1111/j.1751-1097.2011.00977.x (2011).
- 222 de Grujil, F. R. Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **15**, 316-320, doi:10.1159/000064535 (2002).
- 223 Ferlini, C., D'Amelio, R. & Scambia, G. Apoptosis induced by ionizing radiation. The biological basis of radiosensitivity. *Subcell Biochem* **36**, 171-186 (2002).
- 224 Salinas, C. N., Anseth, K.S. Mixed Mode Thiol-Acrylate Photopolymerizations for the Synthesis of PEG-Peptide Hydrogels. *Macromolecules* **41**, 6019-6026 (2008).
- 225 Odian, G. *Reactions of Polymers*. (Wiley, 2004).
- 226 Rouillard, A. D. et al. Methods for photocrosslinking alginate hydrogel scaffolds with high cell viability. *Tissue Eng Part C Methods* **17**, 173-179, doi:10.1089/ten.TEC.2009.0582 (2011).
- 227 Hasan, A., Paul, A., Memic, A. & Khademhosseini, A. A multilayered microfluidic blood vessel-like structure. *Biomed Microdevices* **17**, 88, doi:10.1007/s10544-015-9993-2 (2015).
- 228 Lin, C. C., Ki, C. S. & Shih, H. Thiol-norbornene photo-click hydrogels for tissue engineering applications. *J Appl Polym Sci* **132**, doi:10.1002/app.41563 (2015).
- 229 Kolb, H. C., Finn, M.G., Sharpless K.B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **40**, 2004-2021 (2001).
- 230 Held, K. D. & Biaglow, J. E. Role of copper in the oxygen radical-mediated toxicity of the thiol-containing radioprotector dithiothreitol in mammalian cells. *Radiat Res* **134**, 375-382 (1993).
- 231 Lorson, T. et al. Sterilization Methods and Their Influence on Physicochemical Properties and Bioprinting of Alginate as a Bioink Component. *ACS Omega* **5**, 6481-6486, doi:10.1021/acsomega.9b04096 (2020).
- 232 Galante, R., Pinto, T. J. A., Colaco, R. & Serro, A. P. Sterilization of hydrogels for biomedical applications: A review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **106**, 2472-2492, doi:10.1002/jbm.b.34048 (2018).
- 233 Karajanagi, S. S. et al. Application of a dense gas technique for sterilizing soft biomaterials. *Biotechnol Bioeng* **108**, 1716-1725, doi:10.1002/bit.23105 (2011).

- 234 Halpern, J. M., Gormley, C. A., Keech, M. & von Recum, H. A. Thermomechanical Properties, Antibiotic Release, and Bioactivity of a Sterilized Cyclodextrin Drug Delivery System. *J Mater Chem B* **2**, 2764-2772, doi:10.1039/C4TB00083H (2014).
- 235 Lou, X. & Chirila, T. V. Swelling behavior and mechanical properties of chemically cross-linked gelatin gels for biomedical use. *J Biomater Appl* **14**, 184-191, doi:10.1177/088532829901400204 (1999).
- 236 Begam, T., Nagpal, A.K.; Singhal, R. A comparative study of swelling properties of hydrogels based on poly(acrylamide-co-methyl methacrylate) containing physical and chemical crosslinks *Journal of Applied Polymer Science* **89**, 779-786 (2003).
- 237 Reinoso, R. F., Telfer, B. A. & Rowland, M. Tissue water content in rats measured by desiccation. *J Pharmacol Toxicol Methods* **38**, 87-92, doi:10.1016/s1056-8719(97)00053-1 (1997).
- 238 Kiricuta, I. C., Jr. & Simplaceanu, V. Tissue water content and nuclear magnetic resonance in normal and tumor tissues. *Cancer Res* **35**, 1164-1167 (1975).
- 239 Grimm, A. *Synthese und Charakterisierung gelatinebasierter Hydrogele*, Kallsruher Institut für Technologie, (2020).
- 240 Noshadi, I. *et al.* Engineering Biodegradable and Biocompatible Bio-ionic Liquid Conjugated Hydrogels with Tunable Conductivity and Mechanical Properties. *Sci Rep* **7**, 4345, doi:10.1038/s41598-017-04280-w (2017).
- 241 Tanan, W., Panichpakdee, J. Saengsuwan, S. Novel biodegradable hydrogel based on natural polymers: Synthesis, characterization, swelling/reswelling and biodegradability. *European Polymer Journal* **112**, 678-687 (2019).
- 242 Tan, H. M., K.G. Injectable, Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Materials* **3**, 1746-1767, doi:10.3390/ma3031746 (2010).
- 243 Vandooren, J. *et al.* Gelatin degradation assay reveals MMP-9 inhibitors and function of O-glycosylated domain. *World J Biol Chem* **2**, 14-24, doi:10.4331/wjbc.v2.i1.14 (2011).
- 244 Kavanagh, G. M., Ross-Murphy, S.B. Rheological characterisation of polymer gels. *Progress in Polymer Science* **23**, 533-562 (1998).
- 245 Liu, W. *et al.* Extrusion Bioprinting of Shear-Thinning Gelatin Methacryloyl Bioinks. *Adv Healthc Mater* **6**, doi:10.1002/adhm.201601451 (2017).
- 246 Matsunaga, T. & Shibayama, M. Gel point determination of gelatin hydrogels by dynamic light scattering and rheological measurements. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **76**, 030401, doi:10.1103/PhysRevE.76.030401 (2007).
- 247 Van Vlierberghe, S. S., E. Effect of Cryogenic Treatment on the Rheological Properties of Gelatin Hydrogels. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **25**, 498-512 (2010).
- 248 Mouser, V. H. *et al.* Yield stress determines bioprintability of hydrogels based on gelatin-methacryloyl and gellan gum for cartilage bioprinting. *Biofabrication* **8**, 035003, doi:10.1088/1758-5090/8/3/035003 (2016).
- 249 Cheng, D. Yield stress: A time-dependent property and how to measure it. *Rheologica Acta* **25**, 542-554 (1986).
- 250 Aubin, H. *et al.* Directed 3D cell alignment and elongation in microengineered hydrogels. *Biomaterials* **31**, 6941-6951, doi:10.1016/j.biomaterials.2010.05.056 (2010).
- 251 Ruoslahti, E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 697-715, doi:10.1146/annurev.cellbio.12.1.697 (1996).

- 252 Yang, F. *et al.* The effect of incorporating RGD adhesive peptide in polyethylene glycol diacrylate hydrogel on osteogenesis of bone marrow stromal cells. *Biomaterials* **26**, 5991-5998, doi:10.1016/j.biomaterials.2005.03.018 (2005).
- 253 Lutolf, M. P. *et al.* Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5413-5418, doi:10.1073/pnas.0737381100 (2003).
- 254 Benton, J. A., Fairbanks, B. D. & Anseth, K. S. Characterization of valvular interstitial cell function in three dimensional matrix metalloproteinase degradable PEG hydrogels. *Biomaterials* **30**, 6593-6603, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.08.031 (2009).
- 255 Larsen, M., Artym, V. V., Green, J. A. & Yamada, K. M. The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 463-471, doi:10.1016/j.ceb.2006.08.009 (2006).
- 256 Horobin, R. W., Kiernan, J.A. *Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine.* (BIOS Scientific Publ, 2002).
- 257 Scientific, T. User Guide: Calcein-AM. (2019).
- 258 Roth, C. Sicherheitsdatenblatt Propidiumiodid.
- 259 Cui, J. *et al.* Multicellular Co-Culture in Three-Dimensional Gelatin Methacryloyl Hydrogels for Liver Tissue Engineering. *Molecules* **24**, doi:10.3390/molecules24091762 (2019).
- 260 Miyazaki, H. *et al.* A novel strategy to engineer pre-vascularized 3-dimensional skin substitutes to achieve efficient, functional engraftment. *Sci Rep* **9**, 7797, doi:10.1038/s41598-019-44113-6 (2019).
- 261 Greene, T. C.-C., L. Modular Cross-Linking of Gelatin-Based Thiol–Norbornene Hydrogels for in Vitro 3D Culture of Hepatocellular Carcinoma Cells. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **1**, 1314-1323 (2015).
- 262 Geraud, C. K., P.; Goerd, S. Vaskuläre Nischen: Endothelzellen als multifunktionale gewebe- und standortspezifische Teamplayer im gesunden und erkrankten Organismus. *Journal of the German Society of Dermatology* **12**, 685-690 (2014).
- 263 Monteiro, N. H., W.; Franca, C.M.; Athirasala, A.; Bertassoni, L.E. Engineering Microvascular Networks in LED Light-Cured Cell-Laden Hydrogels. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **4**, 2563–2570 (2018).
- 264 Feitelson, M. A. *et al.* Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Semin Cancer Biol* **35 Suppl**, S25-S54, doi:10.1016/j.semcancer.2015.02.006 (2015).
- 265 Wright Muelas, M., Ortega, F., Breitling, R., Bendtsen, C. & Westerhoff, H. V. Rational cell culture optimization enhances experimental reproducibility in cancer cells. *Sci Rep* **8**, 3029, doi:10.1038/s41598-018-21050-4 (2018).
- 266 Rajabzadeh, N., Fathi, E. & Farahzadi, R. Stem cell-based regenerative medicine. *Stem Cell Investig* **6**, 19, doi:10.21037/sci.2019.06.04 (2019).
- 267 Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147, doi:10.1126/science.284.5411.143 (1999).
- 268 Gimble, J. M. & Nuttall, M. E. Adipose-derived stromal/stem cells (ASC) in regenerative medicine: pharmaceutical applications. *Curr Pharm Des* **17**, 332-339, doi:10.2174/138161211795164220 (2011).
- 269 Kon, E. *et al.* Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long

- bones. *J Biomed Mater Res* **49**, 328-337, doi:10.1002/(sici)1097-4636(20000305)49:3<328::aid-jbm5>3.0.co;2-q (2000).
- 270 Jones, E. A., Giannoudis, P. V. & Kouroupis, D. Bone repair with skeletal stem cells: rationale, progress to date and clinical application. *Ther Adv Musculoskelet Dis* **8**, 57-71, doi:10.1177/1759720X16642372 (2016).
- 271 Jakab, K. *et al.* Tissue engineering by self-assembly of cells printed into topologically defined structures. *Tissue Eng Part A* **14**, 413-421, doi:10.1089/tea.2007.0173 (2008).
- 272 Norotte, C., Marga, F. S., Niklason, L. E. & Forgacs, G. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. *Biomaterials* **30**, 5910-5917, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.06.034 (2009).
- 273 Guillemot, F., Mironov, V. & Nakamura, M. Bioprinting is coming of age: Report from the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux (3B'09). *Biofabrication* **2**, 010201, doi:10.1088/1758-5082/2/1/010201 (2010).
- 274 Arslan-Yildiz, A. *et al.* Towards artificial tissue models: past, present, and future of 3D bioprinting. *Biofabrication* **8**, 014103, doi:10.1088/1758-5090/8/1/014103 (2016).
- 275 Neuwelt, E. A. *et al.* Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nat Rev Neurosci* **12**, 169-182, doi:10.1038/nrn2995 (2011).
- 276 Cserr, H. F. & Bundgaard, M. Blood-brain interfaces in vertebrates: a comparative approach. *Am J Physiol* **246**, R277-288, doi:10.1152/ajpregu.1984.246.3.R277 (1984).
- 277 Abbott, N. J., Ronnback, L. & Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* **7**, 41-53, doi:10.1038/nrn1824 (2006).
- 278 Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R. & Begley, D. J. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* **37**, 13-25, doi:10.1016/j.nbd.2009.07.030 (2010).
- 279 Lippmann, E. S., Al-Ahmad, A., Palecek, S. P. & Shusta, E. V. Modeling the blood-brain barrier using stem cell sources. *Fluids Barriers CNS* **10**, 2, doi:10.1186/2045-8118-10-2 (2013).
- 280 Armulik, A., Abramsson, A. & Betsholtz, C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* **97**, 512-523, doi:10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7 (2005).
- 281 Banerjee, S. & Bhat, M. A. Neuron-glia interactions in blood-brain barrier formation. *Annu Rev Neurosci* **30**, 235-258, doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094345 (2007).
- 282 Booth, R. & Kim, H. Characterization of a microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier (muBBB). *Lab Chip* **12**, 1784-1792, doi:10.1039/c2lc40094d (2012).
- 283 Nakagawa, S. *et al.* A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int* **54**, 253-263, doi:10.1016/j.neuint.2008.12.002 (2009).
- 284 Sims, D. E. Diversity within pericytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **27**, 842-846, doi:10.1046/j.1440-1681.2000.03343.x (2000).
- 285 Miller, D. S. Regulation of P-glycoprotein and other ABC drug transporters at the blood-brain barrier. *Trends Pharmacol Sci* **31**, 246-254, doi:10.1016/j.tips.2010.03.003 (2010).
- 286 Poduslo, J. F., Curran, G. L. & Berg, C. T. Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood-brain barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5705-5709, doi:10.1073/pnas.91.12.5705 (1994).

- 287 Bell, R. D. & Ehlers, M. D. Breaching the blood-brain barrier for drug delivery. *Neuron* **81**, 1-3, doi:10.1016/j.neuron.2013.12.023 (2014).
- 288 Moxon, S. R. *et al.* Blended alginate/collagen hydrogels promote neurogenesis and neuronal maturation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **104**, 109904, doi:10.1016/j.msec.2019.109904 (2019).
- 289 Iwashita, M. *et al.* Brain-stiffness-mimicking tilapia collagen gel promotes the induction of dorsal cortical neurons from human pluripotent stem cells. *Sci Rep* **9**, 3068, doi:10.1038/s41598-018-38395-5 (2019).
- 290 Ji, S. & Guvendiren, M. Recent Advances in Bioink Design for 3D Bioprinting of Tissues and Organs. *Front Bioeng Biotechnol* **5**, 23, doi:10.3389/fbioe.2017.00023 (2017).
- 291 Nam, S. Y. & Park, S. H. ECM Based Bioink for Tissue Mimetic 3D Bioprinting. *Adv Exp Med Biol* **1064**, 335-353, doi:10.1007/978-981-13-0445-3_20 (2018).
- 292 Ali, M. *et al.* A Photo-Crosslinkable Kidney ECM-Derived Bioink Accelerates Renal Tissue Formation. *Adv Healthc Mater* **8**, e1800992, doi:10.1002/adhm.201800992 (2019).
- 293 Ooi, H. W. *et al.* Thiol-Ene Alginate Hydrogels as Versatile Bioinks for Bioprinting. *Biomacromolecules* **19**, 3390-3400, doi:10.1021/acs.biomac.8b00696 (2018).
- 294 Skardal, A. *et al.* A hydrogel bioink toolkit for mimicking native tissue biochemical and mechanical properties in bioprinted tissue constructs. *Acta Biomater* **25**, 24-34, doi:10.1016/j.actbio.2015.07.030 (2015).
- 295 Leucht, A., Volz, A. C., Rogal, J., Borchers, K. & Kluger, P. J. Advanced gelatin-based vascularization bioinks for extrusion-based bioprinting of vascularized bone equivalents. *Sci Rep* **10**, 5330, doi:10.1038/s41598-020-62166-w (2020).
- 296 Bociaga, D., Bartniak, M., Grabarczyk, J. & Przybyszewska, K. Sodium Alginate/Gelatin Hydrogels for Direct Bioprinting-The Effect of Composition Selection and Applied Solvents on the Bioink Properties. *Materials (Basel)* **12**, doi:10.3390/ma12172669 (2019).
- 297 Wang, X. *et al.* Gelatin-Based Hydrogels for Organ 3D Bioprinting. *Polymers (Basel)* **9**, doi:10.3390/polym9090401 (2017).
- 298 Kirsch, M. *et al.* Gelatin-Methacryloyl (GelMA) Formulated with Human Platelet Lysate Supports Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation and Enhances the Hydrogel's Mechanical Properties. *Bioengineering (Basel)* **6**, doi:10.3390/bioengineering6030076 (2019).
- 299 Sun, M. *et al.* Synthesis and Properties of Gelatin Methacryloyl (GelMA) Hydrogels and Their Recent Applications in Load-Bearing Tissue. *Polymers (Basel)* **10**, doi:10.3390/polym10111290 (2018).
- 300 Klotz, B. J., Gawlitta, D., Rosenberg, A., Malda, J. & Melchels, F. P. W. Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication-Based Tissue Repair. *Trends Biotechnol* **34**, 394-407, doi:10.1016/j.tibtech.2016.01.002 (2016).
- 301 Shih, H. & Lin, C. C. Cross-linking and degradation of step-growth hydrogels formed by thiol-ene photoclick chemistry. *Biomacromolecules* **13**, 2003-2012, doi:10.1021/bm300752j (2012).
- 302 Hanslick, J. L. *et al.* Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiol Dis* **34**, 1-10, doi:10.1016/j.nbd.2008.11.006 (2009).

- 303 Quintero, N., Stashenko, E. E. & Fuentes, J. L. The influence of organic solvents on estimates of genotoxicity and antigenotoxicity in the SOS chromotest. *Genet Mol Biol* **35**, 503-514, doi:10.1590/S1415-47572012000300018 (2012).
- 304 Fedorovich, N. E., Wijnberg, H. M., Dhert, W. J. & Alblas, J. Distinct tissue formation by heterogeneous printing of osteo- and endothelial progenitor cells. *Tissue Eng Part A* **17**, 2113-2121, doi:10.1089/ten.TEA.2011.0019 (2011).
- 305 Gillispie, G. *et al.* Assessment methodologies for extrusion-based bioink printability. *Biofabrication* **12**, 022003, doi:10.1088/1758-5090/ab6f0d (2020).
- 306 Tronci, G., Russell, S. J. & Wood, D. J. Photo-active collagen systems with controlled triple helix architecture. *J Mater Chem B* **1**, 3705-3715, doi:10.1039/C3TB20720J (2013).
- 307 Liu, J., Chuah, Y. J., Fu, J., Zhu, W. & Wang, D. A. Co-culture of human umbilical vein endothelial cells and human bone marrow stromal cells into a micro-cavitary gelatin-methacrylate hydrogel system to enhance angiogenesis. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **102**, 906-916, doi:10.1016/j.msec.2019.04.089 (2019).
- 308 Wehrle, M., Koch, F., Zimmermann, S., Koltay, P., Zengerle, R., Stark, G.B., Strassburg, S., Finkelzeller, G. Examination of Hydrogels and Mesenchymal Stem Cell Sources for Bioprinting of Artificial Osteogenic Tissues. *Cellular and Molecular Bioengineering* **12**, 583-597 (2019).
- 309 Laronda, M. M. *et al.* A bioprosthetic ovary created using 3D printed microporous scaffolds restores ovarian function in sterilized mice. *Nat Commun* **8**, 15261, doi:10.1038/ncomms15261 (2017).
- 310 Ouyang, L., Highley, C. B., Sun, W. & Burdick, J. A. A Generalizable Strategy for the 3D Bioprinting of Hydrogels from Nonviscous Photo-crosslinkable Inks. **29**, doi:10.1002/adma.201604983 (2017).
- 311 Galarraga, J. H., Kwon, M. Y. & Burdick, J. A. 3D bioprinting via an in situ crosslinking technique towards engineering cartilage tissue. *Sci Rep* **9**, 19987, doi:10.1038/s41598-019-56117-3 (2019).
- 312 Blaeser, A. *et al.* Controlling Shear Stress in 3D Bioprinting is a Key Factor to Balance Printing Resolution and Stem Cell Integrity. *Adv Healthc Mater* **5**, 326-333, doi:10.1002/adhm.201500677 (2016).
- 313 Chang, R., Emami, K., Wu, H. & Sun, W. Biofabrication of a three-dimensional liver micro-organ as an in vitro drug metabolism model. *Biofabrication* **2**, 045004, doi:10.1088/1758-5082/2/4/045004 (2010).
- 314 Homan, K. A. *et al.* Bioprinting of 3D Convolute Renal Proximal Tubules on Perfusable Chips. *Sci Rep* **6**, 34845, doi:10.1038/srep34845 (2016).
- 315 Johnson, B. N. *et al.* 3D printed nervous system on a chip. *Lab Chip* **16**, 1393-1400, doi:10.1039/c5lc01270h (2016).
- 316 Knowlton, S., Yenilmez, B. & Tasoglu, S. Towards Single-Step Biofabrication of Organs on a Chip via 3D Printing. *Trends Biotechnol* **34**, 685-688, doi:10.1016/j.tibtech.2016.06.005 (2016).
- 317 Lee, H. & Cho, D. W. One-step fabrication of an organ-on-a-chip with spatial heterogeneity using a 3D bioprinting technology. *Lab Chip* **16**, 2618-2625, doi:10.1039/c6lc00450d (2016).
- 318 Wu, W., DeConinck, A. & Lewis, J. A. Omnidirectional printing of 3D microvascular networks. **23**, H178-183, doi:10.1002/adma.201004625 (2011).

-
- 319 Miller, J. S. *et al.* Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues. *Nat Mater* **11**, 768-774, doi:10.1038/nmat3357 (2012).
- 320 Shao, L., Gao, Q., Xie, C. *et al.* . Sacrificial microgel-laden bioink-enabled 3D bioprinting of mesoscale pore networks. *Bio-Design and Manufacturing volume 3*, 30-39 (2020).
- 321 Yu, F. & Choudhury, D. Microfluidic bioprinting for organ-on-a-chip models. *Drug Discov Today* **24**, 1248-1257, doi:10.1016/j.drudis.2019.03.025 (2019).
- 322 <https://opencv.org/>.

9 Anhang

9.1 Sterilitätsuntersuchung der Hydrogele

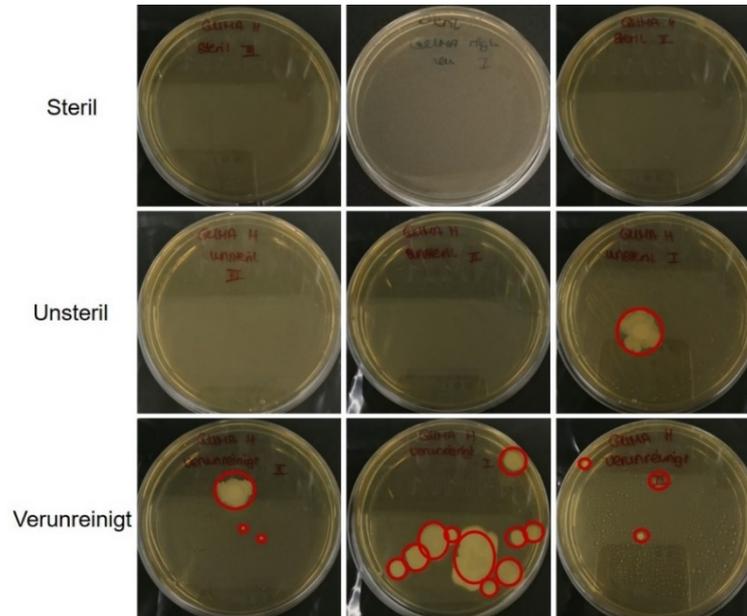


Abbildung 126: Aufnahmen der Agarplatten zur Sterilitätsuntersuchung von GelMA-V2 high. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 29 °C. GelMA-V2 high wurde steril in DPBS^{-/-}, unsteril in DPBS^{-/-} und, durch Kontakt mit dem Boden, gezielt verunreinigt in DPBS^{-/-} gelöst. Die Bestimmung erfolgte jeweils in Triplicaten (Bilder von links nach rechts). Einzelne Kolonien der Mikroorganismen sind rot markiert.

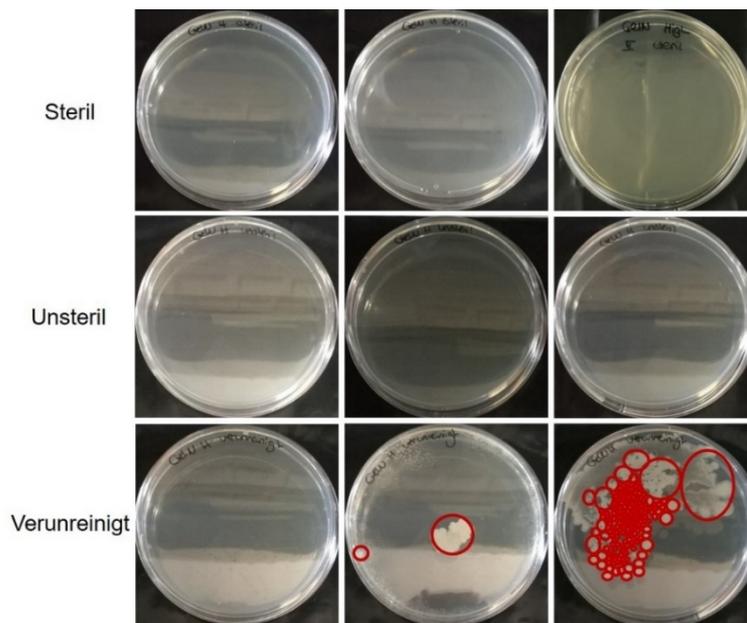


Abbildung 127: Aufnahmen der Agarplatten zur Sterilitätsuntersuchung von GelNB high. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 29 °C. GelNB high wurde steril in DPBS^{-/-}, unsteril in DPBS^{-/-} und, durch Kontakt mit dem Boden, gezielt verunreinigt in DPBS^{-/-} gelöst. Die Bestimmung erfolgte jeweils in Triplikaten (Bilder von links nach rechts). Einzelne Kolonien der Mikroorganismen sind rot markiert.

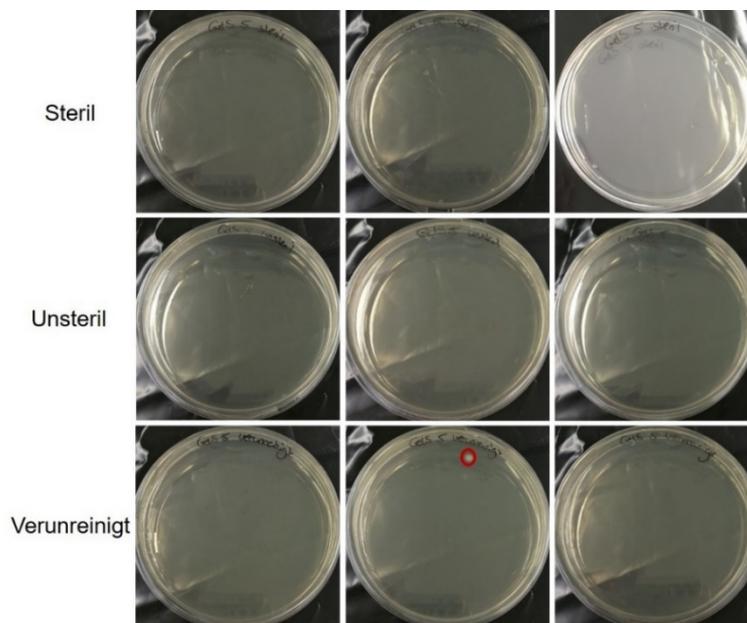


Abbildung 128: Aufnahmen der Agarplatten zur Sterilitätsuntersuchung von GelS medium. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 29 °C. GelS medium wurde steril in DPBS^{-/-}, unsteril in DPBS^{-/-} und, durch Kontakt mit dem Boden, gezielt verunreinigt in DPBS^{-/-} gelöst. Die Bestimmung erfolgte jeweils in Triplikaten (Bilder von links nach rechts). Einzelne Kolonien der Mikroorganismen sind rot markiert.

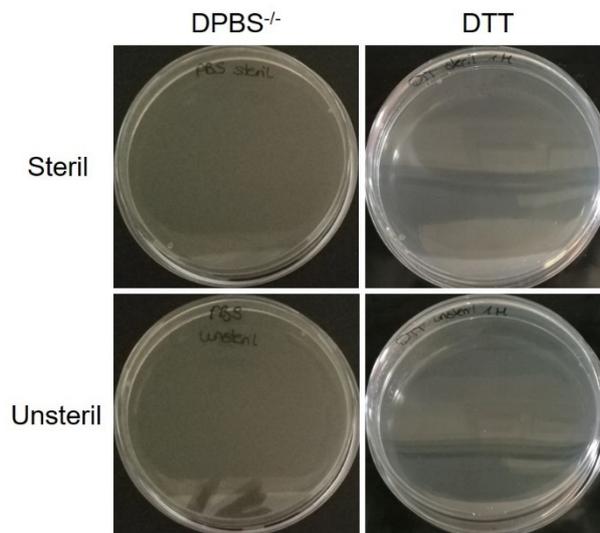


Abbildung 129: Aufnahmen der Agarplatten zur Sterilitätsuntersuchung des Lösungsmittels DPBS^{-/-} und des Crosslinkers DTT. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 29 °C. Sowohl DPBS^{-/-} als auch DTT wurden als sterile und unsterile Lösung aufgetragen.

9.2 Rheologische Charakterisierung der Hydrogele

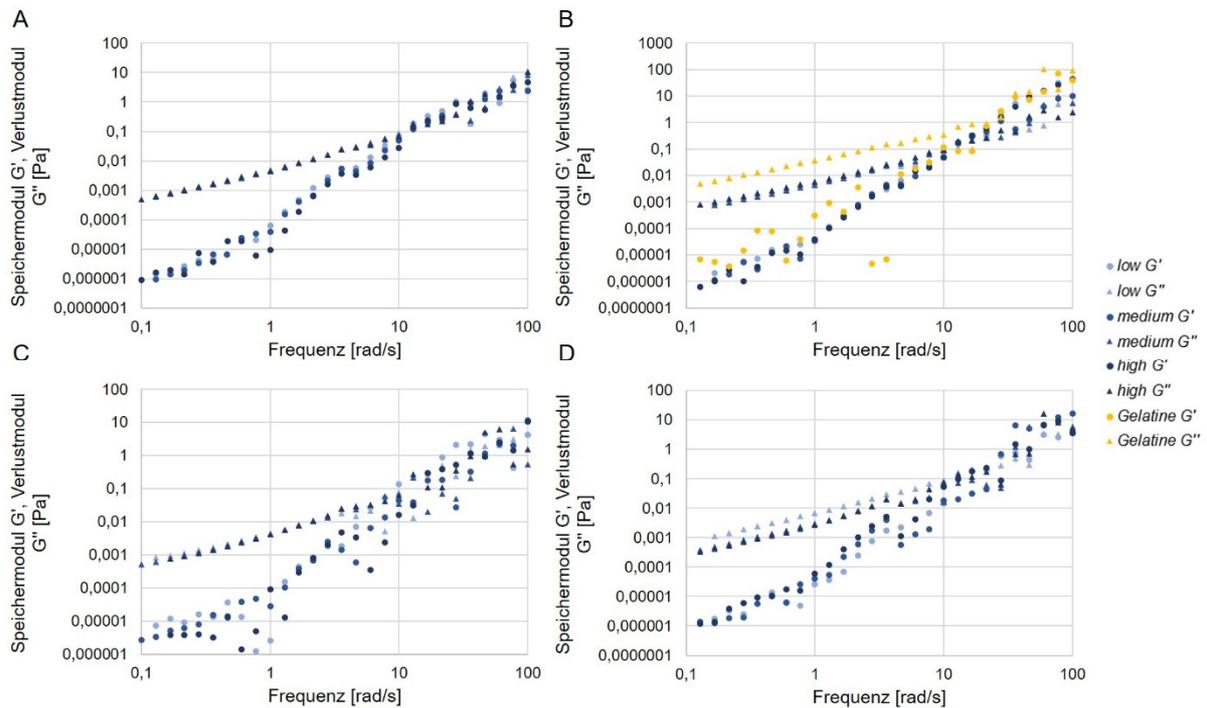


Abbildung 130: Daten des Frequenzdurchlaufs (Speichermodule G' , Verlustmodule G'') für die vier verschiedenen Gelatine-basierten Hydrogele bei 37 °C jeweils in den drei Varianten low, medium und high. **A:** GelMA-V1, **B:** GelMA-V2 und Gelatine, **C:** GelNB/DTT, **D:** GelNB/GelS.

9.3 Extrusionsdruck zellbeladener Hydrogele

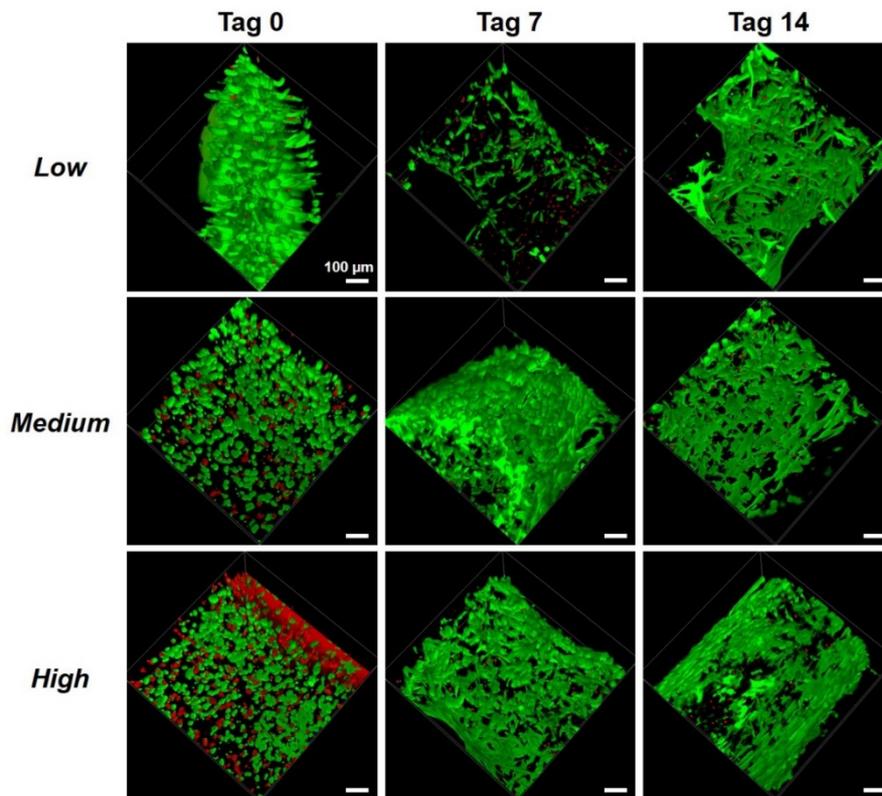


Abbildung 131: Kultivierung und Lebend/Tot-Färbung der gedruckten NHDF mit GelMA-V2 low, medium und high als zugehörige Biotinten (5 % GelMA-V2 mit 0,3 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml). Die Lebend/Tot-Färbung mit $4 \mu\text{M}$ Calcein-AM (grün, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$) und $0,02 \text{ mg/ml}$ Propidiumiodid (rot, $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}650 \text{ nm}$) wurde zu den Zeitpunkten Tag 0, Tag 7 und Tag 14 nach dem Extrusionsdruckprozess durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: $300 \mu\text{m}$, Schrittgröße $5 \mu\text{m}$). Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Leica LasX-Software. Maßstab: $100 \mu\text{m}$.

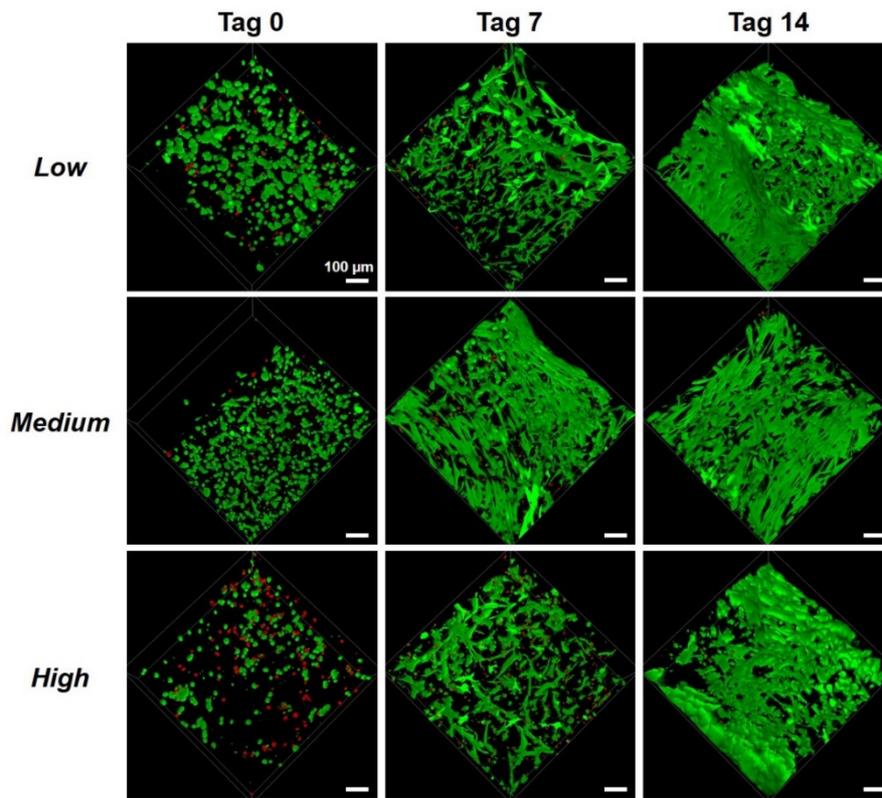


Abbildung 132: Kultivierung und Lebend/Tot-Färbung der gedruckten NHDF mit GelNB/DTT low, medium und high als zugehörige Biotinten (5 % GelNB mit 5,4 mM, 8mM oder 15 mM DTT und mit 0,03 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml). Die Lebend/Tot-Färbung mit $4 \mu\text{M}$ Calcein-AM (grün, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$) und $0,02 \text{ mg/ml}$ Propidiumiodid (rot, $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}650 \text{ nm}$) wurde zu den Zeitpunkten Tag 0, Tag 7 und Tag 14 nach dem Extrusionsdruckprozess durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: $300 \mu\text{m}$, Schrittgröße $5 \mu\text{m}$). Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Leica LasX-Software. Maßstab: $100 \mu\text{m}$.

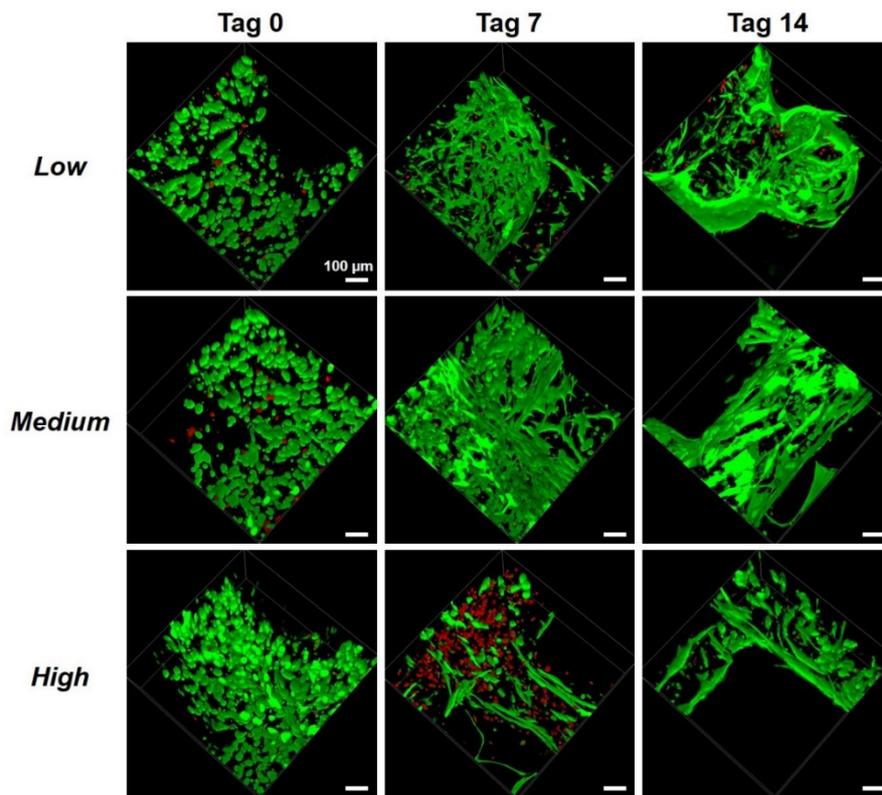


Abbildung 133: Kultivierung und Lebend/Tot-Färbung der gedruckten NHDF mit GelNB/GelS low, medium und high als zugehörige Biotinten (5 % GelNB, 5 % GelS mit 0,03 % LAP und $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml). Die Lebend/Tot-Färbung mit $4 \mu\text{M}$ Calcein-AM (grün, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$) und $0,02 \text{ mg/ml}$ Propidiumiodid (rot, $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}650 \text{ nm}$) wurde zu den Zeitpunkten Tag 0, Tag 7 und Tag 14 nach dem Extrusionsdruckprozess durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Konfokalmikroskop Leica TCE SPE, 10x Objektiv/dry, Zoom: 1,5) und die Aufnahme von Z-Stacks (Höhe: $300 \mu\text{m}$, Schrittgröße $5 \mu\text{m}$). Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Leica LasX-Software. Maßstab: $100 \mu\text{m}$.

10 Danksagung

Zunächst möchte ich PROF. DR. UTE SCHEPERS für die Möglichkeit danken in ihrem Arbeitskreis an dem spannenden Thema der Biotintenenwicklung zu arbeiten. Danke dir UTE für deine stetige Unterstützung die du mir in den Jahren meiner Promotion hast zukommen lassen.

PROF. DR. MATTHIAS FRANZREB möchte ich für die Übernahme des Korreferats, seine Teilnahme in meinem TAC-Komitee und für die hilfreichen Ratschläge danken.

All meinen lieben Kolleginnen und Kollegen aus dem Arbeitskreis möchte ich ganz herzlich für die tolle Arbeitsatmosphäre danken. Die gegenseitige Unterstützung macht unsere Gruppe zu etwas ganz Besonderem, und lies mich jeden Morgen gerne zu euch ins Labor kommen. TAMARA MOLITOR, NICOLE PLESCHKA, HANNAH BUNTZ und JULIANA PFEIFER, vielen Dank für die tolle gemeinsame Zeit. Bei MICHAEL GRÜN möchte ich mich für die großartige Unterstützung bei technischen Fragen bedanken. Mit all meinen Anliegen hast du mir immer direkt weitergeholfen.

An dieser Stelle auch noch ein herzliches Dankeschön an die ehemaligen Mitarbeiter CHRISTOPH GRÜN, DR. EVA ZITTEL, DR. VANESSA KAPPINGS, DR. BETTINA FLECK und DR. ILONA WEHL. Ihr habt mir in meiner Anfangszeit mit all meinen Fragestellungen organisatorischer oder fachlicher Art sehr geholfen. Bei meinen Bachelor- und Masterstudenten CLARINE, JOHANNA, EBRU, SONJA L. und ALISA möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit bedanken.

Ein ganz großes Dankeschön geht an DOMINIK FESER, ANNA MESCHKOV, TOBIAS GÖCKLER, REBECCA PFISTER und XENIA KEMPTER. Euch darf ich nicht nur Kolleginnen und Kollegen, sondern auch meine Freunde nennen. DOMINIK vielen Dank für unsere tollen Gespräche, gemeinsame Entspannungspausen und deine Unterstützung bei jeglicher meiner Fragen. Liebe ANNA dir danke ich für dein immer offenes Ohr, unsere Teepausen und unseren tollen gemeinsamen Ausflügen ins Kasino, auf die Rennbahn oder unsere Wellnessstage. TOBIAS und REBECCA, ihr begleitet mich seit Beginn meines Studiums auf meinem Weg in Karlsruhe und es ist ein tolles Gefühl, dass wir nun zusammen das festgesteckte Ziel erreichen. Wir waren in all den Jahren ein tolles Team, auf euch konnte ich immer zählen. Nicht nur in den Praktika und Prüfungen, sondern auch bei der Arbeit an unseren Promotionsprojekten. Danke für die tolle gemeinsame Zeit während dem Studium, der Promotion und hoffentlich auch danach. Liebe XENIA, auch dir danke ich für die tolle gemeinsame Zeit im Labor und die vielen tollen Momente außerhalb. Auf dich und deine Unterstützung konnte ich mich zu 100 % verlassen. Ob bei der tollen Zusammenarbeit im Labor am Projekt der Biotinten, bei der Erledigung unserer organisatorischen und administrativen Aufgaben, oder auch bei unserem wöchentlichen Sportkurs. Ohne dich wäre auch der Arbeitsweg nur halb so unterhaltsam gewesen.

Ein großes Dankeschön auch an BRUNA MACIEL, für die Unterstützung bei den rheologischen Messungen und für die Kooperation bei der Simulation des Scherstress.

Bei FRANK KIRSCHHÖFER möchte ich mich für die hilfreichen Ratschläge und Unterstützung bei Analysefragen bedanken.

Bei meinen Kooperationspartnern in Freiburg, FRITZ KOCH und VADYM BURCHAK möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit bedanken und die Möglichkeit die Hydrogele in Anwendungsgebieten der Knochen- und Knorpelbildung einzusetzen.

Bei der Graduiertenschule möchte ich mich für die Weiterbildungsmöglichkeiten bedanken. Auch bei PROF. DR. BREITLING möchte ich mich für die Teilnahme in meinem TAC-Komitee und die hilfreichen Ratschläge bedanken.

Der LANDESGRADUIERTENFÖRDERUNG möchte ich für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotion danken.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner FAMILIE bedanken. Bei meinen ELTERN, die mich in allen Entscheidungen meines bisherigen Werdeganges stets unterstützt haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten, bei meiner lieben SCHWESTER die immer auf meiner Seite steht und bei meinem Freund PHILIPP, der mir immer den Rücken stärkt und mich doch immer wieder aufs Neue aus meiner Komfortzone holt. Danke dafür.