

Gelatine-basierte Hydrogele für den 3D Biodruck von Gewebe-modellen

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. Xenia Kempter
aus
Ludwigsburg, Deutschland

1. Referentin: Prof. Dr. Ute Schepers
 2. Referentin: PD Dr. Beate Monika Köberle
- Tag der mündlichen Prüfung: 13. Dezember 2021

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Ute Schepers am Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT, Campus Nord) in der Zeit von Oktober 2018 bis November 2021 angefertigt.

Ich versichere wahrheitsgemäß, die Arbeit selbstständig verfasst, alle benutzten Hilfsmittel vollständig und genau angegeben und alles kenntlich gemacht zu haben, was aus Arbeiten anderer unverändert oder mit Abänderungen entnommen wurde sowie die Satzung des KIT zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet zu haben.

Ein guter Anfang braucht Begeisterung,
ein gutes Ende Disziplin.

Prof. Dr. Hans-Jürgen Quadbeck-Seeger

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Einleitung | 3 |
| 1.1 | Tissue Engineering | 3 |
| 1.2 | 3D Biodruck | 4 |
| 1.2.1 | 3D Biodruck Technologien | 6 |
| 1.3 | Biotinten | 10 |
| 1.3.1 | Anforderungen an Materialien für Biotinten | 10 |
| 1.3.2 | Hydrogele..... | 12 |
| 1.3.3 | Rheologie..... | 16 |
| 1.4 | Organ-on-a-chip Systeme | 18 |
| 1.4.1 | Blutgefäße..... | 20 |
| 2 | Zielsetzung..... | 21 |
| 3 | Ergebnisse I – Hydrogele ohne Vernetzer | 23 |
| 3.1 | Synthese und Charakterisierung der Photopolymere..... | 24 |
| 3.1.1 | Analyse der verwendeten Gelatine..... | 24 |
| 3.1.2 | GelMA | 25 |
| 3.1.3 | GelNB | 29 |
| 3.1.4 | GelS..... | 32 |
| 3.2 | Polymerisation der Photopolymere zum Hydrogel | 35 |
| 3.2.1 | Phototoxizität des Aushärtungssystems Omnicure S2000..... | 36 |
| 3.2.2 | Polymerisation von GelMA und GelNB/GelS | 37 |
| 3.3 | Sterilisation der Hydrogele | 41 |
| 3.3.1 | Probenvorbereitung und Sterilisationsprozess | 42 |
| 3.3.2 | Einfluss auf Gelatine | 43 |
| 3.3.3 | Einfluss auf den Funktionalisierungsgrad und die Polymerisation | 43 |
| 3.3.4 | Einfluss auf die viskoelastischen Eigenschaften und die Geliertemperatur..... | 47 |
| 3.3.5 | Sterilität..... | 51 |
| 3.3.6 | Fazit..... | 53 |
| 3.4 | Biokompatibilität von GelMA und GelNB/GelS..... | 53 |
| 3.4.1 | Toxizität von Abbauprodukten | 54 |
| 3.4.2 | 3D Einbettung von Fibroblasten | 58 |
| 3.4.3 | Proliferation von NHDF in GelMA und GelNB/GelS..... | 66 |
| 3.4.4 | Kultivierung länger als 21 Tage | 69 |
| 3.4.5 | NHDF in großen Strukturen..... | 74 |
| 3.4.6 | Vergleich der Biokompatibilität von GelMA und GelNB/GelS..... | 77 |
| 3.5 | 3D Biodruck | 78 |
| 3.5.1 | Extrusionsbasierter 3D Biodruck | 79 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 3.5.2 | Bestimmung eines Richtwertes für die Drucktemperatur | 82 |
| 3.5.3 | Bestimmung eines Richtwertes für die Extrusionsgeschwindigkeit | 84 |
| 3.5.4 | Druck von Gitterstrukturen aus zellenthaltenden Hydrogelen | 86 |
| 3.5.5 | Aufbau eines Blut-Hirn-Schranke-Modells mit dem BioSpot BP | 89 |
| 3.5.6 | Aufbau von perfundierbaren Kanalstrukturen mit dem BioSpot BP..... | 94 |
| 3.5.7 | Direct Laser Writing..... | 108 |
| 3.6 | Zusammenfassung Teil I – Hydrogele ohne Vernetzer | 114 |
| 4 | Ergebnisse II – Hydrogele mit Vernetzer | 115 |
| 4.1 | Gelatine-basiertes Rückgrat GeIS | 115 |
| 4.2 | Synthese und Charakterisierung der Vernetzer | 115 |
| 4.2.1 | Peptidsynthese mit der Submonomermethode | 116 |
| 4.2.2 | Charakterisierung der Vernetzer und Hydrogele..... | 119 |
| 4.3 | Biokompatibilität | 136 |
| 4.3.1 | Viabilität von eingekapselten HepG2..... | 136 |
| 4.3.2 | Viabilität von eingekapselten NHDF | 139 |
| 4.3.3 | Proliferation von eingekapselten HepG2 und NHDF..... | 140 |
| 4.3.4 | Kultivierung von eingekapselten NHDF in einer Multiwell Platte | 142 |
| 4.4 | 3D Biodruck | 147 |
| 4.4.1 | Viskoelastische Eigenschaften | 147 |
| 4.4.2 | Drucktemperatur | 148 |
| 4.4.3 | NHDF | 149 |
| 4.5 | Zusammenfassung Teil II – Hydrogele mit Vernetzer | 151 |
| 5 | Diskussion..... | 153 |
| 6 | Material und Methoden..... | 163 |
| 6.1 | Verwendete Zelllinien/Primärzellen | 163 |
| 6.2 | Material und Reagenzien - Zellkultur | 163 |
| 6.3 | Zusammengesetzte Medien und Puffer | 165 |
| 6.4 | Chemikalien und Reagenzien..... | 166 |
| 6.5 | Verbrauchsmaterial | 167 |
| 6.6 | Geräte und Software | 168 |
| 6.7 | Synthese | 171 |
| 6.7.1 | Photopolymere | 171 |
| 6.7.2 | Peptide..... | 173 |
| 6.8 | Charakterisierung der Photopolymere | 175 |
| 6.8.1 | TNBSA-Assay | 175 |
| 6.9 | Hydrogele ohne Vernetzer | 176 |
| 6.9.2 | Bestimmung der optimalen Aushärtungsbedingungen..... | 177 |
| 6.10 | Hydrogele mit Vernetzer..... | 177 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 6.10.1 | Herstellung von Hydrogelen mit Vernetzer | 177 |
| 6.10.2 | Bestimmung der optimalen Aushärtungsbedingungen..... | 178 |
| 6.10.3 | Bestimmung freier Thiole nach der Aushärtung – Hydrogele mit Vernetzer ... | 180 |
| 6.10.4 | Analyse des Quellverhaltens von Hydrogelen mit Vernetzer | 180 |
| 6.10.5 | Degradation von Hydrogelen mit Vernetzern..... | 180 |
| 6.11 | Rheologie..... | 181 |
| 6.11.1 | Geltemperatur | 181 |
| 6.11.2 | Scherviskosität und Fließgrenze – GelMA, GelNB/GelS..... | 181 |
| 6.11.3 | Viskoelastische Eigenschaften von GelS/P1 | 181 |
| 6.11.4 | Scherviskosität und Fließgrenze - GelS/P1 | 182 |
| 6.11.5 | Speichermodul von Hydrogelen mit Vernetzer - ElastoSens Bio | 182 |
| 6.12 | Diffusion in Hydrogele ohne Vernetzer | 183 |
| 6.13 | Autoklavieren von Photopolymerlösungen zur Sterilisation..... | 183 |
| 6.13.1 | Probenvorbereitung..... | 183 |
| 6.13.2 | Einfluss auf den Funktionalisierungsgrad und die Aushärtung..... | 184 |
| 6.13.3 | Einfluss auf die viskoelastischen Eigenschaften..... | 184 |
| 6.13.4 | Bestimmung der Sterilität | 185 |
| 6.14 | Zellkultur | 185 |
| 6.14.1 | Kultivierung von HepG2 | 185 |
| 6.14.2 | Kultivierung von NHDF | 186 |
| 6.14.3 | Einfrieren von HepG2 und NHDF | 186 |
| 6.14.4 | Kultivierung von HUVEC | 186 |
| 6.14.5 | Einfrieren von HUVEC..... | 187 |
| 6.14.6 | Kultivierung von HA und HBVP | 187 |
| 6.14.7 | Kultivierung von hCMEC/D3..... | 188 |
| 6.14.8 | Humane Neuronen..... | 188 |
| 6.15 | MTT-Assay zur Bestimmung von Zytotoxizität..... | 188 |
| 6.15.1 | Zytotoxizität der Vernetzer | 189 |
| 6.15.2 | Zytotoxizität der Aushärtungssysteme..... | 189 |
| 6.15.3 | Zytotoxizität von Abbauprodukten der Hydrogele | 189 |
| 6.16 | Färbungen von Zellen | 190 |
| 6.16.1 | Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM und PI | 190 |
| 6.16.2 | CellTracker™-Färbung des Cytosols..... | 191 |
| 6.16.3 | HOECHST33342-Färbung der Zellkerne..... | 191 |
| 6.17 | Einbetten von Zellen in Hydrogele..... | 191 |
| 6.17.1 | 2,5D Gele..... | 191 |
| 6.17.2 | Zellebeladene Hydrogele ohne Vernetzer | 191 |
| 6.18 | PrestoBlue-Assay zur Quantifizierung der Proliferation | 195 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 6.19 | 3D Biodruck | 196 |
| 6.19.1 | Festlegen des Referenzpunktes eines Druckkopfes am BioSpot BP | 196 |
| 6.19.2 | Bestimmung geeigneter Druckparameter für die Photopolymerlösungen | 196 |
| 6.19.3 | Extrusionsdruck von Gitterstrukturen mit zellbeladenen Hydrogelen | 198 |
| 6.19.4 | Aufbau eines BBB-Modells auf einem PC-Substrat | 199 |
| 6.19.5 | Kanalstrukturen aus Hydrogelen ohne Vernetzer | 201 |
| 6.20 | Direct Laser Writing..... | 204 |
| 6.20.1 | Zusammensetzung der Photopolymerlösung | 204 |
| 6.20.2 | Schreiben von zellenthaltenden Strukturen | 204 |
| 7 | Abkürzungsverzeichnis | 205 |
| 8 | Literatur..... | 209 |
| 9 | Anhang..... | 223 |
| 9.1 | Sterilität der Photopolymerlösungen..... | 223 |
| 9.2 | Bestimmung der optimalen Druckparameter | 224 |
| 9.2.1 | Drucktemperatur | 224 |
| 9.2.2 | Extrusionsgeschwindigkeit | 225 |
| 9.2.3 | Berechnung des Filamentdurchmessers | 226 |
| 9.3 | Technische Zeichnung des MX-Systems..... | 226 |
| 9.4 | Tiefenfärbung von in Hydrogelen mit Vernetzer eingebetteten NHDF | 227 |
| | Danksagung | 231 |

Zusammenfassung

Die Anzahl verfügbarer Spenderorgane ist in den letzten Jahren zurückgegangen. Die Vision von künstlichen Organen als Ersatz für geschädigte Gewebe und Organe ist so in den Fokus von Forschern gerückt. Durch die Nachbildung von Gewebe und Organen können Defekte nach Verletzungen oder kranke Organe ersetzt werden, für die regenerative Medizin spielen künstliche Organe eine zunehmend größere Rolle. Forschern ist es gelungen durch Kombination von Zellen und Materialien Gewebe *in vitro* nachzubilden. Der Aufbau dieser Gewebe erfolgt zunehmend durch computer-gestützte Fabrikationsmethoden wie den 3D Biodruck. Durch den 3D Biodruck können Zellen und Materialien präzise zu dreidimensionalen Strukturen verarbeitet werden, die den *in vivo* Aufbau des Gewebes gut nachbilden. Entscheidend für den erfolgreichen Aufbau eines künstlichen Gewebes mit dem 3D Biodruck ist die Wahl eines geeigneten Materials, der sogenannten Biotinte. In der Vergangenheit hat sich gezeigt, dass Hydrogele viele Eigenschaften besitzen, die jenen der natürlichen extrazellulären Matrix ähneln. Hydrogele bilden eine hydratisierte, mechanisch stabile Umgebung, in die Zellen eingebettet werden können. Für den Einsatz im *Tissue Engineering* stehen verschiedene Hydrogele zu Verfügung, die natürlicher oder synthetischer Herkunft sein können. Die semi-synthetischen Hydrogele vereinen dabei die Eigenschaften natürlicher Hydrogele mit den Eigenschaften von synthetischen Hydrogelen, so können die Vorteile synthetischer Materialien mit der Bioaktivität/Biokompatibilität von natürlichen Hydrogelen vereint werden. Das photoreaktive semi-synthetische Hydrogel GelMA ist im *Tissue Engineering* bereits etabliert. Die während der Vernetzung ablaufende Reaktion schädigt jedoch eingekapselte Zellen, zusätzlich werden große Mengen Photoinitiator für die Vernetzung benötigt. Um diese Probleme zu umgehen, wurde in dieser Arbeit ein Hydrogel entwickelt, welches sich durch eine lichtinduzierte Thiol-En Reaktion vernetzen lässt. Durch die Modifikation von Gelatine mit Norbornengruppen und Thiolen wurden die Photopolymere GelNB und GelS erhalten. Die erhaltenen Hydrogele wurden umfassend charakterisiert. Hierzu gehörten die Evaluierung der Eignung für den Einsatz unter sterilen Bedingungen, die Untersuchung der Biokompatibilität und Überprüfung der Eignung als Biotinte in unterschiedlichen 3D Drucktechnologien. Die Hydrogele zeigten sich insgesamt als biokompatibel und geeignet für den extrusionsbasierten 3D Biodruck und das *direct laser writing* (DLW). Es wurden Druckprozesse mit GelNB/GelS entwickelt und optimiert, die den Aufbau von Gewebemodellen ermöglichten. Durch das Bedrucken eines *Organ-on-a-chip* Systems aus Polycarbonat konnte ein Blut-Hirn-Schranke-Modell mit den Hydrogelen GelMA und GelNB/GelS aufgebaut werden. Um perfundierbare Strukturen ohne harte Materialien wie Polycarbonat zu erhalten, wurde ein extrusionsbasierter Druckprozess und eine Vorrichtung entwickelt, mit dem sich Hohlstrukturen aus Hydrogelen aufbauen ließen. Insgesamt zeigten die GelNB/GelS Hydrogele eine bessere Biokompatibilität und Verarbeitbarkeit als GelMA.

Um einen flexibleren Einsatz von Hydrogelen im Hinblick auf das Einbringen bestimmter bioaktiver Moleküle zu ermöglichen, wurden in dieser Arbeit zusätzlich Peptoide als Vernetzer für GeIS evaluiert. Die synthetisierten Peptoide wurden zunächst toxikologisch untersucht und verschiedenen Polymerisationsbedingungen getestet. Die anschließende Charakterisierung umfasste die Untersuchung des Vernetzungsgrades, die rheologische Charakterisierung, die Analyse des Degradations- und Quellverhalten, die Toxizität der Abbauprodukte und die Biokompatibilität. Für eingebettete Primärzellen konnte mit bestimmten Peptoiden eine hohe Viabilität und starke Ausrichtung gezeigt werden. Für die Hydrogele mit Vernetzer wurde ebenfalls ein Druckprozess am extrusionsbasierten Biodrucker optimiert. Insgesamt zeigten sich die Hydrogele mit Vernetzer weniger biokompatibel als die Hydrogele ohne Vernetzer GelMA und GeINB/GeIS.

1 Einleitung

Der Mangel an Spenderorganen hat die Nachfrage nach artifiziellem Gewebe in den letzten Jahren stark ansteigen lassen. Durch die Generierung von künstlichen Geweben und Organen könnte nicht nur der Mangel an Spenderorganen und -geweben, sondern auch Probleme wie die Abstoßung von Transplantaten umgangen werden.^{1,2} Die Herstellung von künstlichen Geweben ermöglicht es, patientenspezifische Zellen zu verwenden, wodurch eine Abstoßung unwahrscheinlicher wird.³ Weltweit haben sich in den letzten Jahren Forscher damit beschäftigt, Materialien, Methoden und Prozesse zu entwickeln, die eine möglichst genaue Nachbildung von Geweben und Organen ermöglicht.⁴ Der schnell wachsende Forschungsbereich *Tissue Engineering* legt den Fokus auf die Erforschung von Geweben und deren Nachbildung.

1.1 Tissue Engineering

Chapekar *et al.* definierten bereits 1988 *Tissue Engineering* als die „Anwendung von Methoden und Prinzipien aus den Ingenieurwissenschaften und *Life Sciences*, um grundlegende Struktur-Funktionszusammenhänge von Säugetiergeweben zu verstehen und Ersatzgewebe zu entwickeln, um krankhafte Organe zu regenerieren“.⁵ Durch die Kombination von Zellen, Gerüststrukturen und Wachstumsfaktoren sollen Gewebe gebildet werden, welche implantierbar sind.⁶ Diese traditionelle Auffassung von der Generierung von artifiziellem Gewebe beruht auf der zufälligen Verteilung von Zellen und Wachstumsfaktoren auf Gerüststrukturen. Zellen konnten so in das defekte Gewebe eingebracht werden, wobei die Gerüststruktur die Anordnung für einige Zeit stützte.⁶ Die Unterstützung der dreidimensionalen (3D) Anordnung ist von großer Bedeutung, da Zellen in einer zweidimensionalen (2D) Anordnung kein natürliches Verhalten zeigen.⁷ Petersen *et al.* konnten 1992 zeigen, dass humane Brustepithelzellen in einer 2D Kultivierung im Monolayer das Verhalten von Tumorzellen zeigten, während sie bei der Kultivierung in 3D ihre natürliche Funktion wiedererlangten.⁷ Dabei spielt der Kontakt zu anderen Zellen und der extrazellulären Matrix (engl.: *extracellular matrix*, ECM) eine entscheidende Rolle.⁴ Die ECM umgibt alle Zellen eines Organismus. Sie sorgt für mechanische Stabilität und ist beteiligt an Regulationsmechanismen, Differenzierung, Proliferation und der Signaltransduktion.⁸⁻¹⁰ Ihr Hauptbestandteil sind strukturgebende fibrilläre Proteine wie Kollagen, Fibronectin und Laminin. Proteoglykane und Wasser füllen die Zwischenräume.¹¹ Durch bestimmte Beschichtungen der Zellkulturmaterialien können den Zellen Adhäsionsdomänen und damit die Polarisation vorgegeben werden. Diese Vorgaben entsprechen jedoch nicht den *in vivo* Gegebenheiten und die Zellen verlieren ihre gewebespezifische Funktion, wie Metabolismus, Morphologie, Differenzierung und Proliferation (Abbildung 1).¹²⁻¹⁴

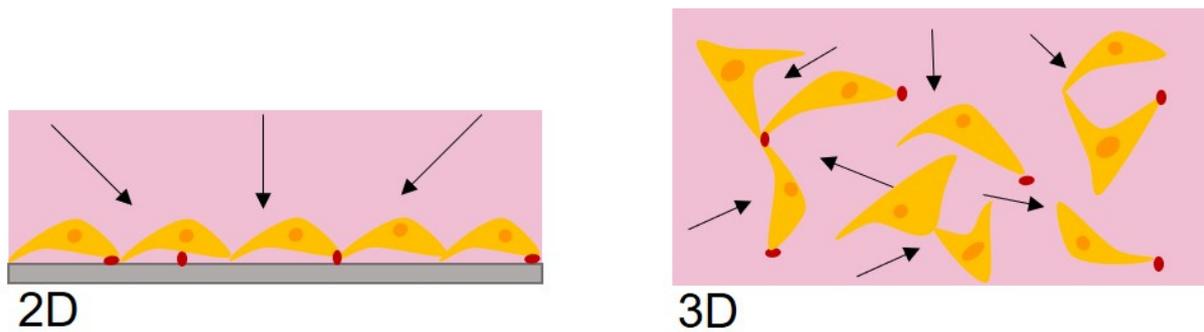


Abbildung 1: Schematische Darstellung von zweidimensionalen und dreidimensionalen Zellkulturen. Zellen, die als Monolayer zweidimensional kultiviert werden, zeigen kein natürliches Verhalten. Sie werden von biologisch aktiven Molekülen und Nährstoffen nur von einer Seite erreicht, der Kontakt zu anderen Zellen in drei Dimensionen fehlt, was zu einer unnatürlichen Morphologie und Funktionsverlust führt. Zellen, welche dreidimensional angeordnet sind, zeigen gewebespezifisches Verhalten. Sie können in drei Dimensionen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte ausbilden. Dadurch werden die *in vivo* Gegebenheiten besser nachgebildet. Modifiziert nach Kapalczynka et al.¹⁵

Durch die Anordnung von Zellen in 3D Strukturen konnten Vorteile gegenüber der Kultivierung in 2D erreicht werden.^{16,17} Diese ersten Strukturen bestanden jedoch aus zufällig angeordneten Zellen auf den oben genannten Gerüststrukturen, da ihre Herstellung keine präzise Anordnung einzelner Zellen ermöglichte. Als neue Herausforderung zeigte sich also schon in den Anfängen des *Tissue Engineering*, die präzise, kontrollierbare und reproduzierbare Anordnung von Zellen und Materialien zum Gewebe. Heutzutage werden durch verschiedene Biofabrikationstechniken wie den 3D Biodruck die Zellen, Materialien und weitere Moleküle gezielt positioniert.¹⁸ Analog zu additiven Fertigungstechniken für Kunststoffe, Metalle oder Pulver werden mit dem 3D Biodruck dreidimensionale Strukturen aus biokompatiblen Materialien und Zellen durch computergestützte Verfahren aufgebaut.¹⁹ Die erhaltenen Strukturen können funktionale Gewebe nachbilden, aber auch Modelle zur Untersuchung von bioaktiven Molekülen oder Krankheiten darstellen.^{20,21}

1.2 3D Biodruck

Durch computergestützte Positionierungsverfahren werden zellbeladene 3D Strukturen in einem schichtweisen Vorgehen zur Nachbildung von Geweben und Organen aufgebaut.²² Im Gegensatz zum 3D Druck von Gerüststrukturen sind die Zellen bereits während des Druckvorganges im Material enthalten (Abbildung 2).^{18,23} Durch den Aufbau von Strukturen mit dem 3D Biodruck kann auf ein Besiedeln der Strukturen nach dem Druckvorgang verzichtet werden. Die für den Aufbau des gewünschten Gewebes benötigten Zellen werden vor dem Druckvorgang in das zu verdruckende Material eingebracht und so direkt in die Strukturen integriert.²³ Durch die Kombination verschiedener Materialien und Drucktechnologien können dann Strukturen aufgebaut werden, die die *in vivo* Gegebenheiten gut nachbilden. Es ist bereits gelungen durch verschiedene Technologien Blutgefäße, Knochen, Knorpel und Lebergewebe zu drucken.²⁴⁻²⁷ Zur Vorbereitung eines Druckprozesses wird zunächst

computer-gestützt ein 3D Modell der gewünschten Struktur erstellt. Die Daten für diese computer-gestützt designten (engl.: *computer-aided design*, CAD) Modelle (CAD-Modelle) können zum Beispiel aus Computer- oder Magnetresonanztomographien erhalten werden.^{28,29} Abhängig davon, welche Technologie und welche Materialien genutzt werden, erfordert der Druckprozess eine Vor- und Nachbearbeitung der gedruckten Strukturen. Bei der Vorbereitung wird das zu verdruckende Material und die Zellen kombiniert (Biotinte) und in die für die Verarbeitung benötigte Form gebracht. Im eigentlichen Druckprozess wird die Struktur durch unterschiedliche Technologien (Kapitel 1.2.1) aufgebaut. In der Nachbearbeitung wird die gedruckte Struktur abschließend so bearbeitet, dass eine Kultivierung über längere Zeiträume unter physiologischen Bedingungen möglich ist.⁶ Bis mit dem 3D Biodruck vollständig funktionsfähige Organe gedruckt werden können, werden wohl noch Jahrzehnte vergehen. Dennoch ist es heutzutage bereits möglich funktionsfähige Gewebe zu drucken, welche dann zur Simulation von Krankheiten, zum Testen von Wirkstoffen oder zur Implantation für kleine Gewebedefekte eingesetzt werden.³⁰⁻³³

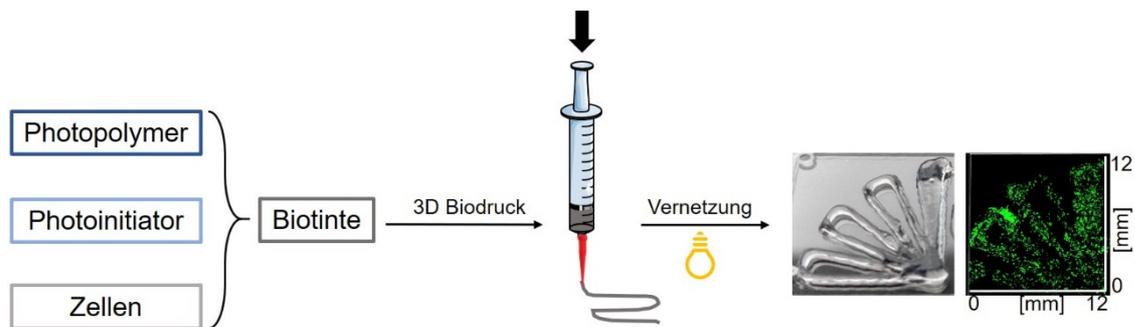


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines 3D Biodruckvorganges. Die Zellen werden mit dem zu verdruckenden Material und Zusätzen zur Biotinte gemischt und durch ein 3D Biodruckverfahren in eine vorgegebene Struktur gebracht.

1.2.1 3D Biodruck Technologien

Zum Aufbau von Geweben aus dem 3D Biodrucker werden verschiedene Technologien genutzt: Extrusionsbasierter 3D Biodruck, Inkjet-basierter 3D Biodruck, Laser-basierter 3D Biodruck.³⁴ Zum Laser-basierten 3D Biodruck zählt neben dem *Laser Induced Forward Transfer* (LIFT) auch das DLW.³⁵ Die grundlegende Funktionsweise der einzelnen Technologien ist in Abbildung 3 gezeigt.

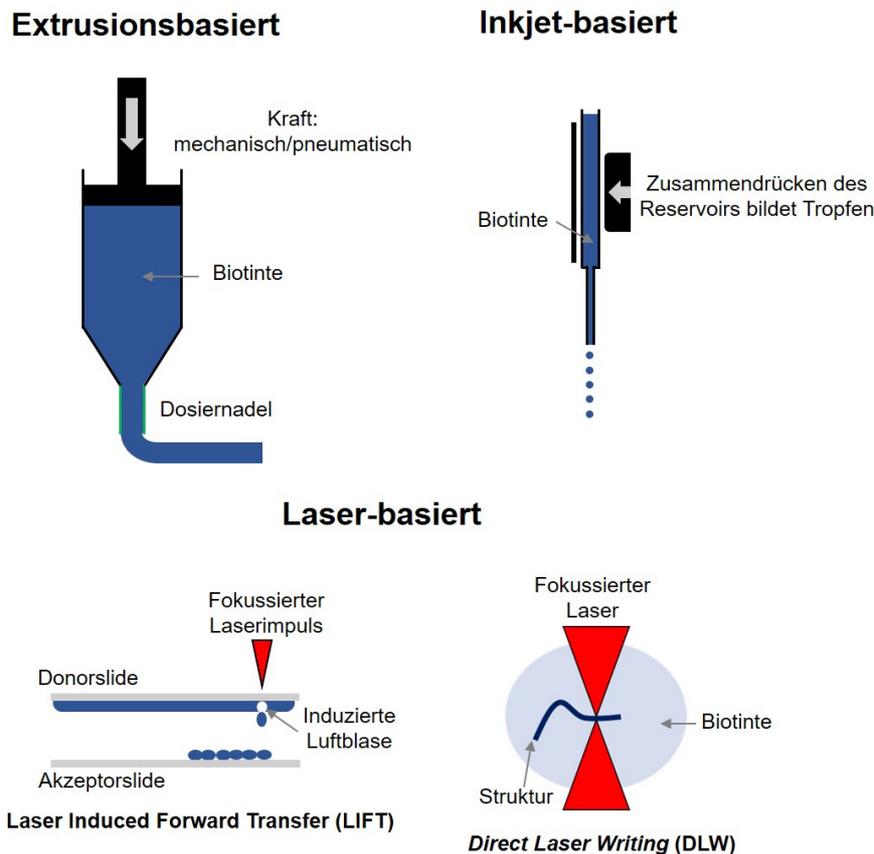


Abbildung 3: Übersicht über die verschiedenen 3D Bioprinting Technologien. Beim extrusionsbasierten 3D Biodruck wird das Material durch eine Nadel dispensiert und computergesteuert präzise abgelegt. Beim Inkjet-basierten 3D Biodruck wird das Material tropfenweise in eine 3D Struktur gebracht. Mit den Laser-basierten Drucktechnologien können verschiedene Materialien verarbeitet werden. Beim LIFT wird das Material durch einen Laserimpuls auf den Akzeptorträger transferiert, beim DLW wird mit einem fokussierten Laser die Struktur in das Material hineingeschrieben. Modifiziert nach Malda et al., Selimis et al.^{6,36}

Beim extrusionsbasierten 3D Biodruck wird durch pneumatische oder mechanische Bewegung eines Kolbens ein kontinuierliches Filament extrudiert.^{35,37} Der Inkjet-basierte 3D Biodruck funktioniert ähnlich wie herkömmliche Inkjet-Drucker im Büro. Durch thermal oder piezoelektrisch gesteuerte Impulse werden kleine Tropfen erzeugt, die durch eine feine Nadel an einer bestimmten Stelle präzise abgelegt werden.²² Eine entscheidende Materialeigenschaft ist beim Inkjet-basierten 3D Biodruck die Oberflächenspannung. Tropfen werden nur geformt, wenn die Oberflächenspannung größer ist als die Ladungen auf der Oberfläche des zu verdruckenden Materials. Werden dem zu verdruckenden Material Zellen zugesetzt, sinkt die Oberflächenspannung und die Tropfenbildung wird erschwert.³⁸ Dieser

Effekt macht den Inkjet-basierten 3D Biodruck ungeeignet für das Verdrucken von hohen Zelldichten (10^6 Zellen/ml).^{38,39} Zusätzlich funktioniert der Inkjet-basierte 3D Biodruck nur mit Materialien mit niedriger Viskosität, liefert aber Auflösungen von 10-50 μm .⁴⁰ Bei den laserbasierten 3D Biodruck Technologien handelt es sich um LIFT und DLW. Beim LIFT wird ein Material durch einen Laserimpuls von einem Donorträger auf einen Akzeptorträger transferriert.⁴¹ Der Donorträger ist dabei mit einem *absorbing layer* und einer Schicht des zu verarbeitenden Materials beschichtet. Durch einen fokussierten Laserimpuls auf dem *absorbing layer* wird eine Luftblase im Material ausgelöst, die einen Tropfen generiert, der auf den Akzeptorträger fällt.⁴² Die Vorteile des LIFT liegen im Fehlen einer Dosiernadel und der damit scherstressfreien Verarbeitung.^{43,44} Mit LIFT können Materialien unterschiedlicher Viskositäten verdruckt werden, die Auflösung beträgt 10-100 μm . Das Verdrucken von 10^8 Zellen/ml stellt kein Problem dar.⁴³ Als alte, aber für den 3D Biodruck neue Technologie ist in den letzten Jahren DLW in den Fokus des *Tissue Engineering* gerückt.^{45,46} Beim DLW wird mit einem fokussierten Laser eine Struktur direkt in einen Tropfen des Materials geschrieben.⁴⁷ Von den vorgestellten Technologien wurden der Extrusionsdruck und DLW näher betrachtet.

1.2.1.1 Extrusionsbasierter 3D Biodruck

Die am häufigsten genutzte Technologie ist der extrusionsbasierte 3D Biodruck.⁴⁸ Beim extrusionsbasierten 3D Biodruck, vergleichbar mit dem *Fusion Deposition Modeling* (FDM), wird das zu verdruckende Material mechanisch oder pneumatisch aus einer Kartusche durch eine Dosiernadel extrudiert.^{35,49} Das extrudierte Filament wird durch computer-gestützte Positionierung in eine bestimmte Form gebracht. In einem schichtweisen Verfahren können so 3D Strukturen aufgebaut werden.^{23,50} Die mechanische Extrusion bietet gegenüber der pneumatischen Extrusion den Vorteil, dass die Extrusion präziser steuerbar ist. Bei der pneumatischen Extrusion kommt es oft zu einer verzögerten Extrusion auf Grund der langsamen Komprimierung der in der Kartusche enthaltenen Luft.^{6,39,51} Mit dem extrusionsbasierten 3D Biodruck können vergleichsweise große Strukturen von mehreren Zentimetern gedruckt werden.⁵⁰ Die Auflösung dieser Technologie ist mit 100-200 μm sehr gering, führt jedoch zu schnellen Fabrikationszeiten.¹ Als Materialien kommen bei dieser Technologie ausschließlich Lösungen mit einer hohen Viskosität in Frage, da das extrudierte Filament bis zur Nachbearbeitung der Struktur stabil bleiben muss.¹ Um zu verhindern, dass die Zellen durch den Scherstress während der Extrusion geschädigt werden, werden Materialien mit einem scherverdünnenden Verhalten im extrusionsbasierten 3D Biodruck eingesetzt.³⁷ In Abbildung 4 ist dargestellt, wie sich scherverdünnende Materialien während des Druckprozesses verhalten.

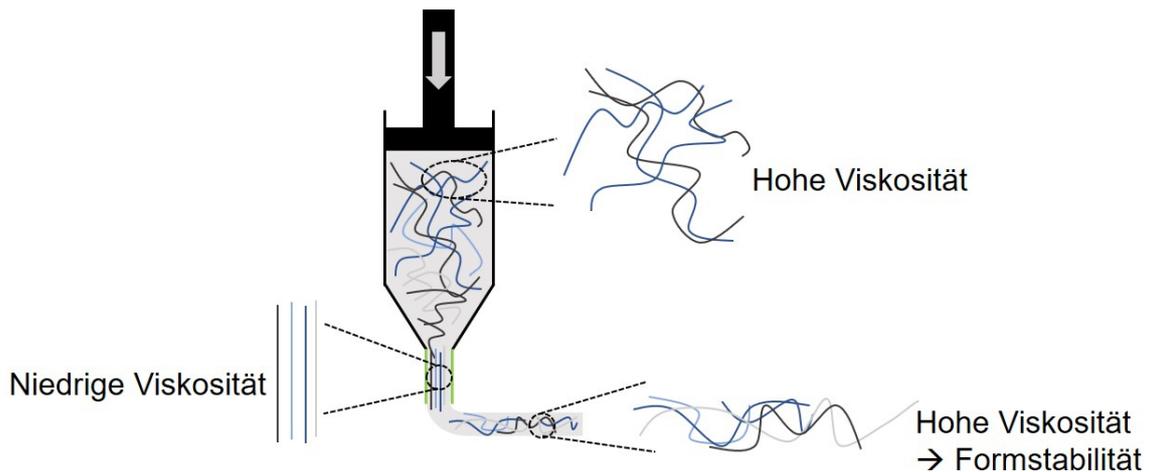


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer scherverdünnenden Biotinte bei der Extrusion durch eine Dosiernadel. In scherverdünnenden Flüssigkeiten nehmen die Polymere bei zunehmender Scherung eine elongierte Form ein und die Viskosität sinkt. Dies passiert bei der Extrusion durch eine Dosiernadel mit kleinem Durchmesser. Modifiziert nach Malda et al, Wilson et al.^{6,52}

Die Viskosität von scherverdünnenden Materialien verringert sich mit Zunahme der Scherung.⁵³ In der Druckerkartusche liegt das zu verdruckende Material mit hoher Viskosität vor. Durch Verringern des Durchmessers bis zur Nadelöffnung, erhöht sich die Scherung des Materials. Dadurch wird die Viskosität verringert, sodass der Austritt aus der Nadelöffnung möglich ist. Sobald das Material die Dosiernadel verlässt, fällt die Scherung weg und die Viskosität erhöht sich.^{6,54} Bei polymeren Materialien liegen die Polymerketten ohne Scherung in einer ungeordneten Weise vor, sodass die Viskosität hoch ist. Dieses physikalisch stabilisierte Netzwerk kann durch die Einwirkung von Scherkräften zerstört werden, bildet sich aber bei Wegnahme der Kräfte zurück.⁵⁵ Werden scherverdünnende Materialien einer Scherung ausgesetzt, so nehmen die Polymerketten eine lineare Anordnung ein und die Viskosität sinkt, nach dem Austritt aus der Nadelöffnung fällt die Scherung weg und das physikalisch stabilisierte Netzwerk bildet sich zurück.⁵⁶ Dieser Effekt ermöglicht zum einen die Extrusion von hochviskosen Materialien durch kleine Durchmesser und zum anderen sorgt die Verringerung der Viskosität auch dafür, dass die Zellen, welche sich in dem Material befinden, einem geringeren Scherstress ausgesetzt sind.³⁷ Die Extrusion von Zellen durch kleine Öffnung setzt die Zellen einem hohen Scherstress aus, der die Zellen schädigen kann. Durch den Einsatz eines geeigneten Materials kann dieser Effekt jedoch verringert werden.^{37,57} Mit dem extrusionsbasierten 3D Biodruck konnten bereits erfolgreich Gewebestrukturen gedruckt werden, es wurde jedoch beobachtet, dass die Viabilitäten durch den Scherstress negativ beeinflusst wurden.⁵⁸⁻⁶¹ Dies verdeutlicht noch einmal, die Relevanz eines geeigneten Materials.³⁹

1.2.1.2 DLW

Das DLW ist die älteste der vorgestellten 3D Drucktechnologien, rückte jedoch erst in den letzten Jahren in den Fokus des *Tissue Engineering*.^{62,63} Durch einen fokussierten Laser werden beim DLW nanoskalige Strukturen jeglicher Geometrie mit sehr hoher Auflösung erzeugt, auf Opfer- und Stützstrukturen kann verzichtet werden.^{64,65} Begründet durch die Zwei-Photonen-Absorption (2PA) ist DLW die 3D Druck Technologie mit der höchsten Auflösung von wenigen Nanometern.³⁶ Da die Polymerisation immer nur im Fokus des Lasers stattfindet, eignet sich DLW besonders für sehr kleine Strukturen, welche Hohlräume oder freistehende Merkmale enthalten. Bei der 2PA müssen zwei Photonen gleichzeitig vom Photoinitiator absorbiert werden, um die Energie für den Übergang in den angeregten Zustand bereitzustellen.⁶⁶ Eine ausreichend hohe Photonendichte für die 2PA ist nur im Fokus des Lasers vorhanden, eine Polymerisation des Materials findet also nur im Fokus des Lasers statt. Dadurch können Strukturen mit Merkmalen <100 nm geschrieben werden.³⁶ Der Materialaufwand für DLW ist sehr gering, für einen Druckvorgang werden typischerweise nur wenige Mikroliter eines Materials benötigt. Nach dem Schreibvorgang wird das Substrat in eine Entwicklungslösung gegeben, um nicht polymerisiertes Material zu entfernen und so eine hochaufgelöste Struktur zu erhalten.⁶⁶ DLW wurde zunächst für die Herstellung von Stützstrukturen eingesetzt, welche nach der Entwicklung und Reinigung mit Zellen besiedelt wurden.⁶⁷ Die zufällige Anordnung der Zellen auf der Stützstruktur ist jedoch im 3D Biodruck nicht erstrebenswert.⁶ Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahren versucht, zellhaltige Materialien zu verschreiben. Für DLW geeignete Materialien müssen photoreaktive Gruppen enthalten, welche durch Anregung durch einen Photoinitiator polymerisiert werden können. Für einen erfolgreichen Schreibvorgang muss eine hohe Dichte von photoreaktiven Gruppen vorhanden sein und die Materialien müssen transparent sein, um ein fokussiertes Einstrahlen des Lasers zu ermöglichen.⁶⁶ Die Viskosität sollte möglichst gering sein, um eine Polymerisation im Laserfokus zu ermöglichen.⁶⁸ Für den Schreibvorgang wird ein Tropfen des Materials auf ein transparentes Substrat gegeben und durch relative Bewegung der Probe zum Laserfokus eine 3D Struktur erzeugt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass DLW in Anwesenheit von Zellen funktioniert und hochaufgelöste Strukturen erzeugt werden können.⁴⁶ Ein entscheidender Faktor im Aufbau von artifiziellen Geweben ist das Material, dieses muss sowohl den Anforderungen der Zellen und den *in vivo* Gegebenheiten gerecht werden, als auch für verschiedene Fabrikationsmethoden geeignet sein.⁶

1.3 Biotinten

Eine Schlüsselrolle beim erfolgreichen Aufbau von artifiziellen Geweben spielt das Material, welches die ECM simulieren soll.⁶⁹⁻⁷¹ Diese künstliche ECM wird zum Aufbau von Geweben mit den gewebespezifischen Zellen gemischt und durch den 3D Biodruck in eine definierte Form gebracht.⁶ Diese sogenannte Biotinte bildet den Grundstein eines artifiziellen Gewebes. Insbesondere synthetische Materialien, welche als Biotinten genutzt werden sollen, müssen den Anforderungen der gewebespezifischen Zellen entsprechen und je nach Anwendung und Verarbeitung die physikalisch-mechanischen Anforderungen der jeweiligen Technologie erfüllen.¹

1.3.1 Anforderungen an Materialien für Biotinten

Durch den Einsatz von Biotinten im 3D Biodruck sollen Gewebestrukturen generiert werden, die den *in vivo* Gegebenheiten entsprechen. Hierzu gehört zum Beispiel die Festigkeit eines Gewebes. So wird für den Aufbau von festen Geweben wie Knochen oder Knorpel ein festeres Material benötigt, als für den Aufbau von weichen Geweben wie Leber oder Niere.^{72,73} Es ist bekannt, dass Zellen über mechanosensitive Eigenschaften die Festigkeit ihrer Umgebung erkennen und darauf reagieren.⁷⁴ Für unterschiedliche Zelltypen wie Fibroblasten und Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass sie ihre Adhäsionseigenschaften und Morphologie mit der Veränderung ihrer Umgebung ebenfalls verändern.⁷⁵ Zusätzlich zu den Anforderungen der Zellen müssen die Materialien bestimmte Anforderungen für den Druckprozess erfüllen. Hierzu gehören, abhängig von der Drucktechnologie, zum Beispiel die Viskosität und der Gelierungsmechanismus.⁶ Die Viskosität sorgt in extrusionsbasierten Druckprozessen für die nötige Formstabilität während des Druckvorganges, der Gelierungsmechanismus bestimmt, wie die Nachverarbeitung einer gedruckten Struktur abläuft. Im Fall von DLW bestimmt der Geliermechanismus den Schreibvorgang selbst.⁷⁶ In beiden Fällen ist es Voraussetzung, dass die Gelierung bei physiologischen oder milden Bedingungen ablaufen, da sie in Anwesenheit von Zellen funktionieren muss. Die Kultivierung der erzeugten Strukturen setzt voraus, dass die verwendeten Materialien biokompatibel und bioabbaubar sind.⁷⁷ Die Bioabbaubarkeit sorgt dafür, dass die eingekapselten Zellen ihre Mikroumgebung remodellieren können und so den *in vivo* Gegebenheiten entsprechen.¹ Die als Biotinte fungierenden Materialien dürfen außerdem die Proliferation, den Metabolismus und die Differenzierung der eingekapselten Zellen nicht negativ beeinflussen. Über Zellinteraktionsdomänen können die eingekapselten Zellen mit dem sie umgebenden Material interagieren, weshalb diese zur Simulation der ECM unabdingbar sind. Durch Verwendung eines Materials mit einer porösen Struktur, kann die Diffusion von Nährstoffen, Signalmolekülen und Gasen gewährleistet werden.⁷⁸ Sollen Materialien erfolgreich als ECM-Ersatz eingesetzt werden, so ist es unerlässlich, dass sie ohne Unterschiede zwischen einzelnen Chargen in großen Mengen bereitgestellt werden können.^{79,80} Durch genau

einstellbare Materialeigenschaften können die Biotinten flexibel an ihre Anwendung angepasst werden. In Abbildung 5 sind die Anforderungen an eine Biotinte für den 3D Biodruck (nicht DLW) dargestellt. Die Biotinte bestimmt durch ihre molekulare Struktur, ihre Konzentration und ihre Zusammensetzung direkt die Gelierung, die Netzwerkstruktur und die Viskosität. Eigenschaften des Druckprozesses beeinflussen die Zellen ebenfalls. So ist die Wahl der Druckernadel entscheidend, welchem Scherstress die Zellen ausgesetzt sind und wie hoch die Auflösung der gedruckten Struktur ist. Zusätzlich bestimmt die Dosiernadel die Fabrikationszeit. Scherstress und Fabrikationszeit beeinflussen wiederum die Zellen in der Biotinte.⁶

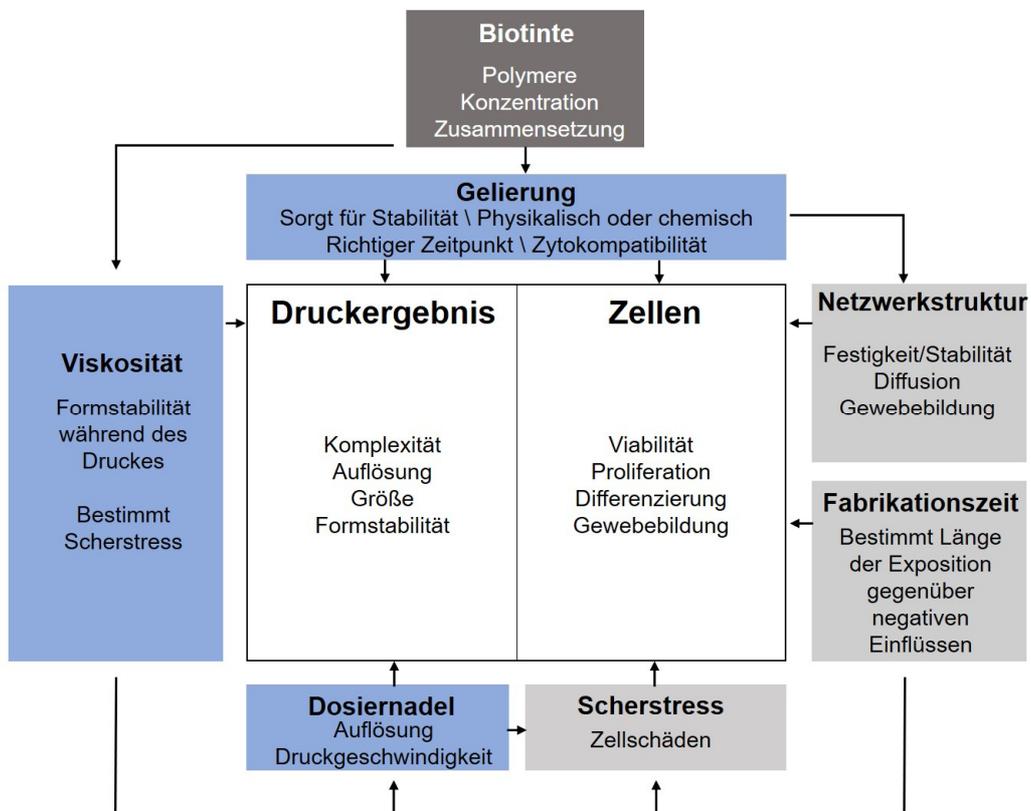


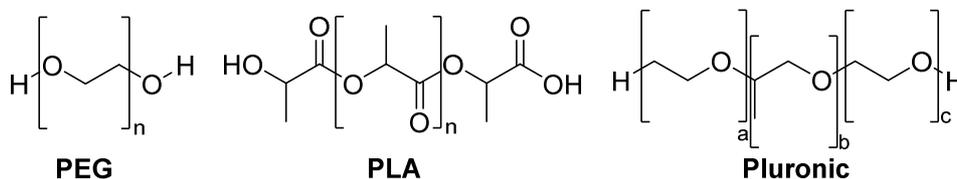
Abbildung 5: Anforderungen und Eigenschaften von Biotinten für den 3D Biodruck im Tissue Engineering. Modifiziert nach Malda et al.⁶

Die Wahl eines geeigneten Materials spielt also die Schlüsselrolle beim Aufbau von Geweben mit dem 3D Biodruck. Die Anforderungen an ein für DLW geeignetes Material sind vor allem chemischer Natur. Es müssen ausreichend viele photoreaktive Gruppen vorhanden sein, damit im Laserfokus eine Polymerisierung stattfindet, zusätzlich wirkten sich eine niedrige Viskosität und hohe Transparenz vorteilhaft aus.⁷⁶ In der Vergangenheit haben sich unterschiedliche synthetische und natürliche Materialien als geeignete Biotinte gezeigt. Hydrogele haben sich dabei als besonders vielversprechend erwiesen, da sie auf Grund ihrer Polymerstruktur viele Eigenschaften der natürlichen ECM aufweisen.⁸¹ Ihre Polymerstruktur ermöglicht das Einbetten von Zellen in eine hydratisierte, mechanisch stabile Umgebung.⁸²

Viele Hydrogele sind außerdem erfolgreich in unterschiedlichen 3D Biodruck Technologien als Biotinte eingesetzt worden.⁴⁰

1.3.2 Hydrogele

Hydrogele sind hydrophile polymere Materialien, welche in der Lage sind, große Mengen wässriger Flüssigkeiten aufzunehmen und zu speichern ohne sich darin zu lösen.⁸³ Ihre Polymerstruktur ermöglicht die Einlagerung von Wasser, sodass ein Gel entsteht. Diese Gele ähneln der nativen ECM in Festigkeit und Wassergehalt und machen sie so zu geeigneten Kandidaten für eine artifizielle ECM.^{84,85} Hydrogele werden bereits erfolgreich als Kontaktlinsen und Wundauflagen in der Medizin eingesetzt.⁸⁶ Die poröse Netzwerkstruktur stellt außerdem sicher, dass Gase, Nährstoffe und Signalmoleküle ungehindert diffundieren können und die eingekapselten Zellen ausreichend versorgt werden.^{87,88} Der hohe Wassergehalt und die mechanische Stabilität ermöglichen es, Zellen in Hydrogelen einzukapseln und die native Mikroumgebung zu simulieren. Im Gegensatz zu Materialien, auf welche Zellen aufgebracht werden, bilden Hydrogele eine Möglichkeit, eine dreidimensionale Mikroumgebung für eingekapselte Zellen zu bilden. Sie sind flexibel und ermöglichen eine Migration und Kommunikation der Zellen in alle Richtungen.⁸⁹ Hydrogele werden nach ihrer Herkunft in natürliche und synthetische Hydrogele klassifiziert. Zu den natürlichen Hydrogelen gehören zum Beispiel Kollagen, Gelatine, Alginat, Hyaluronsäure und Agarose. Vertreter der synthetischen Hydrogele sind zum Beispiel Polyethylenglykol (PEG), Milchsäure (PLA) und Pluronic®.⁸³



Schema 1: Strukturformeln der synthetischen Hydrogele Polyethylenglykol, Milchsäure und Pluronic.

Natürliche Hydrogele verfügen meist über eine gute Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit.⁹⁰ Manche dieser Hydrogele verfügen außerdem über Zellinteraktionsdomänen, welche eine Adhäsion und Migration von Zellen ermöglichen. Natürliche Hydrogele, welche aus der ECM von Wirbeltieren gewonnen werden verfügen unter anderem über die Arginin-Glycin-Asparaginsäure-(RGD)-Domäne, welche es Zellen ermöglicht über Integrinrezeptoren an die Gele zu adhären und sich auszurichten.⁹¹ Aus Zuckern bestehende natürliche Hydrogele wie Agarose oder Alginat, welche zum Beispiel aus Seegrass oder Algen gewonnen werden, verfügen nicht über solche Interaktionsdomänen, wodurch sie keine biologische Aktivität besitzen.⁹² Als nachteilige Eigenschaft der natürlichen Hydrogele hat sich auch die geringe mechanische Stabilität erwiesen, außerdem können sich natürliche Hydrogele stark von Charge zu Charge unterscheiden.⁹³ Synthetische Hydrogele sind hingegen mechanisch

stabiler und weisen eine hohe Konsistenz zwischen einzelnen Chargen auf. Ihre mechanischen und physikalischen Eigenschaften sind durch ihre Synthese kontrollierbar und flexibel an die jeweilige Anwendung anpassbar.⁹⁴ Synthetische Hydrogele verfügen jedoch über keine biologische Funktion; Zellinteraktionsdomänen und Schnittstellen für Enzyme müssen explizit eingebaut werden. Hierfür wird häufig das Tripeptid RGD genutzt.^{95,96} Hydrogele, welche nicht über eine Interaktionsdomäne verfügen, können lediglich als Stützstruktur dienen, da die Zellen nicht mit ihnen interagieren können.⁹⁷ In solchen Hydrogelen findet keine Adhäsion und Ausrichtung der Zellen statt. Die Ausrichtung der Zellen ist schematisch in Abbildung 6 gezeigt.

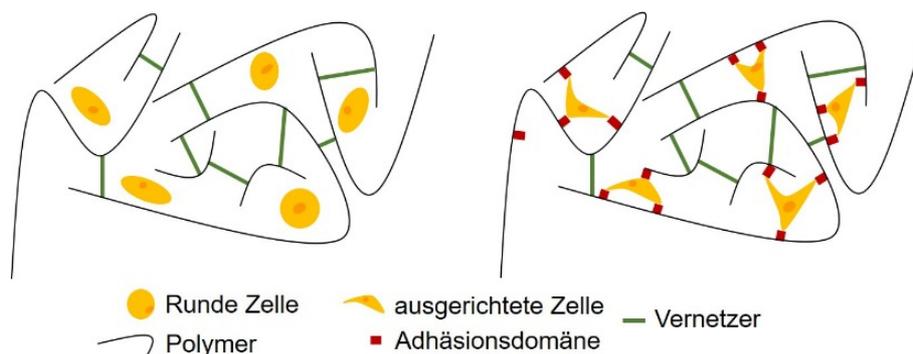


Abbildung 6: Zellen in Hydrogelen ohne Adhäsionsdomänen (links) und mit Adhäsionsdomänen (rechts). Um eine korrekte Funktion der Zellen zu ermöglichen müssen diese unter anderem an die umgebende Matrix adhären und mit ihr interagieren können. Modifiziert nach Tibbitt et al.¹²

Um die Eigenschaften von natürlichen und synthetischen Hydrogelen zu kombinieren, wurden semi-synthetische Hydrogele entwickelt. Semi-synthetische Hydrogele verbinden die Biokompatibilität, Bioaktivität und Bioabbaubarkeit mit der Kontrollierbarkeit und Stabilität von synthetischen Hydrogelen.⁹⁸ Ein bereits im *Tissue Engineering* etabliertes semi-synthetisches Hydrogel ist Gelatinemethacrylamid (GelMA). Durch Modifizierung der Lysin-Seitenketten mit Methacrylsäure wurde ein bei physiologischen Bedingungen stabiles Hydrogel auf Gelatinebasis erhalten. Durch die eingebaute Doppelbindung lässt sich GelMA lichtinduziert vernetzen, sodass kovalente Bindungen entstehen, welche dem Hydrogel bei 37 °C eine erhöhte Stabilität gegenüber reiner Gelatine verleiht. Die Bioaktivität der Gelatine wird durch die Modifikation nicht beeinflusst.⁹⁹ Für den Einsatz als Biotinte müssen Hydrogele über Geliermechanismen verfügen, die den Hydrogelen eine Stabilität bei physiologischen Bedingungen und eine Stabilisierung und Fixierung der Struktur während und nach dem Druckprozess erlauben.

1.3.2.1 Polymerisationsreaktionen

In Abhängigkeit von der zur Verarbeitung verwendeten Drucktechnologie müssen die gedruckten Strukturen während und/oder nach dem Druckprozess gezielt vernetzt werden können.^{6,39} Beim extrusionsbasierten 3D Biodruck ist eine hohe Formstabilität während des Druckprozesses von großer Bedeutung, ebenso die Fixierung der Struktur nach dem Druckvorgang. Das DLW setzt bereits eine bestimmte Vernetzung des Hydrogels während des

Druckvorganges voraus. Grundsätzlich unterscheidet man Vernetzungsreaktionen in physikalische und chemische Vernetzungen.^{100,101} Eine Übersicht über verschiedene Vernetzungsreaktionen ist in Abbildung 7 gezeigt.

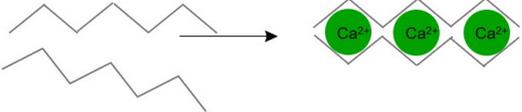
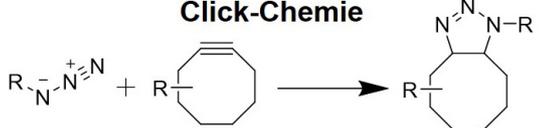
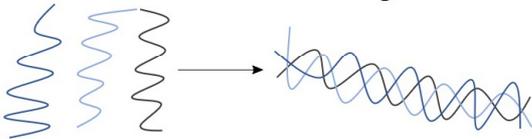
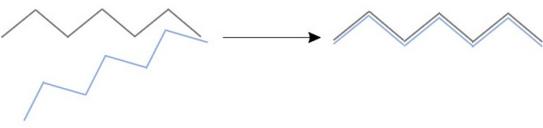
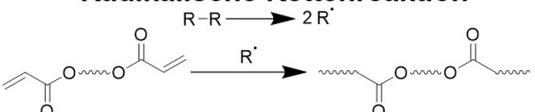
| Physikalisch [reversibel] | Chemisch [kovalent] |
|--|---|
| <p>Ionische Wechselwirkung</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Alginate • Schwache Bindung | <p>Click-Chemie</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Milde Bedingungen • ringspannungsgetrieben |
| <p>Kettenverstrickung</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Gelatine • Abhängig von äußeren Einflüssen | <p>Thiol-En Reaktion</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Milde Bedingungen • Lichtinduziert • Homogene Netzwerke • Spatio-temporal steuerbar  |
| <p>Stereokomplexbildung</p>  <ul style="list-style-type: none"> • PDLA und PLLA | <p>Radikalische Kettenreaktion</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Harsche Bedingungen • Lichtinduziert • Inhomogene Netzwerke • Zeitlich steuerbar  |

Abbildung 7: Übersicht über chemische und physikalische Vernetzungsreaktionen, die im Tissue Engineering eingesetzt werden. Die radikalische Kettenreaktion und die lichtinduzierte Thiol-En Reaktion gehören zu den am häufigsten genutzten chemischen Vernetzungsreaktionen im Tissue Engineering. Die physikalische Vernetzung führt zu schwachen Bindungen und bildet Hydrogele, welche oft nicht stabil genug für den Einsatz im Tissue Engineering sind.

Die physikalischen Vernetzungsreaktionen sind meist reversibel und bilden nur eine schwache Bindung aus.¹⁰² Zu den physikalischen Vernetzungsreaktionen gehören zum Beispiel Kettenverstrickungen von Polymerketten, die Bildung von Wasserstoffbrücken, ionische Wechselwirkungen und hydrophobe Interaktionen.^{6,100,103} Physikalische Vernetzungsprozesse erfordern keine zusätzlichen Chemikalien und laufen in der Regel unter milden Bedingungen ab, was sie im Hinblick auf die Verwendung mit Zellen interessant macht. Beispiele für Hydrogele, welche durch physikalische Vernetzung entstehen, sind Alginate und Gelatine. Alginate wird durch zweiwertige Calcium-Ionen vernetzt, die sich zwischen den Carboxylgruppen der Zuckerketten einlagern und so für eine geordnete Struktur des Alginats sorgen.²² Die ionische Wechselwirkung ist jedoch schwach und kann durch andere zweiwertige Ionen gestört werden.¹⁰⁴ Ein Beispiel für die Kettenverstrickung als Vernetzungsmechanismus ist Gelatine. Die einzelnen Helices renaturieren bei Temperaturen

<30 °C zu Triplehelices.²³ Die Bildung der Triplehelices ist reversibel und Gelatine-Hydrogele verlieren ihre Stabilität mit steigenden Temperaturen.^{23,105} PLA, als Vertreter der synthetischen Hydrogele, lässt sich ebenfalls über einen physikalischen Vernetzungsmechanismus vernetzen. Durch die Bildung von Stereokomplexen lagern sich zwei Polymerketten, zum Beispiel PLLA und PDLA, unterschiedlicher Chiralität an und bilden einen stabilen Komplex. Durch Kupplung von PLA an Polymere wie PEG lassen sich physikalisch vernetzte Hydrogele erzeugen.^{106,107} Diese Zusammenlagerung verläuft jedoch langsam, wodurch sich die Stereokomplexbildung nur bedingt für die Vernetzung von gedruckten Strukturen eignet, eine temporale Kontrolle ist nur eingeschränkt möglich.¹⁰⁷ Als Alternative zu den insgesamt sehr schwachen Bindungen der physikalischen Vernetzungen sind chemische Vernetzungsreaktionen zu sehen. Sie vernetzen Hydrogele durch die Bildung von kovalenten Bindungen. Dieser Vorgang ist nicht reversibel und das entstehende Hydrogel sehr stabil.⁶ Zu den chemischen Vernetzungsreaktionen zählen zum Beispiel Kondensationsreaktionen, Click-Chemie und lichtinduzierte Reaktionen.¹⁰⁸⁻¹¹¹ Click-Reaktionen zeichnen sich durch hohe Ausbeuten, wenig Nebenprodukte und milde Reaktionsbedingungen aus.¹¹² Für die Vernetzung von Hydrogelen für das *Tissue Engineering* hat sich die kupferfreie ringspannungsgetriebene Cycloaddition als geeignet erwiesen.¹¹³ Die Vernetzung eines Azides mit einem Cyclooctin ermöglichte die Vernetzung von funktionalisierter Hyaluronsäure in Gegenwart von Zellen.^{111,114} Die so generierten Gele zeigten großes Potential für den Einsatz als injizierbare Hydrogele für medizinische Anwendungen.³⁰ Die bioorthogonale Reaktion von Aziden mit Cyclooctinen ermöglicht eine Vernetzungsreaktion unter milden Bedingungen, die nicht mit natürlich vorkommenden Molekülen reagiert.^{113,115} Eine weitere chemische Vernetzungsmethode ist die Vernetzung zweier Moleküle durch eine lichtinduzierte radikalische Reaktion.¹¹⁶ Lichtinduzierte Reaktionen bergen den Vorteil, dass sie spatio-temporal kontrollierbar sind. Bei der lichtinduzierten Vernetzung wird die Reaktion zweier funktioneller Gruppen durch Bestrahlung mit Licht induziert. Der dazu benötigte Photoinitiator initiiert dabei die radikalische Reaktion, indem er in freie Radikale zerfällt, die dann die eigentliche Vernetzungsreaktion zwischen den Polymeren starten.^{89,117} Die für lichtinduzierte Vernetzungsreaktionen benötigten photoreaktiven Gruppen sind in natürlichen Hydrogelen nicht vorhanden und müssen erst durch chemische Modifikation dieser eingebracht werden.^{39,100} Die nach der Bestrahlung ablaufende Vernetzungsreaktion kann sich negativ auf die enthaltenen Zellen auswirken, insbesondere die Bestrahlung mit UV-Licht kann mutagen auf Zellen wirken. Um dieses Problem zu umgehen, ist der Einsatz eines Photoinitiators, welcher sichtbares Licht absorbiert, möglich.¹¹⁸ Die meistgenutzten lichtinduzierten Vernetzungsreaktionen sind die radikalische Kettenpolymerisation und die lichtinduzierte Thiol-En Reaktion.^{117,119} Da manche 3D Biodruck Technologien bestimmte physikalische und mechanische Eigenschaften voraussetzen, ist Gelatine als Basis für semi-synthetische

Hydrogele gut geeignet. Durch ihre Thermosensitivität kann zum Beispiel die Viskosität an die Anforderung verschiedener Drucktechnologien angepasst werden. So kann zum Beispiel im extrusionsbasierten 3D Biodruck durch Drucken bei niedrigen Temperaturen die Formstabilität der Biotinte erhöht werden und die Struktur durch eine lichtinduzierte Vernetzung nach dem Druckvorgang final stabilisiert werden.^{39,101} Die Vernetzung eines Hydrogels hat außerdem Einfluss auf dessen mechanische Eigenschaften, eine stärkere Vernetzung führt zu Hydrogelen mit einer erhöhten Stabilität. Dies führt wiederum dazu, dass die Hydrogele langsamer abgebaut werden. Zellen benötigen mehr Zeit, um ihre Umgebung zu remodelieren und in die Gele zu migrieren.⁶ Außerdem beeinflusst die Vernetzungsdichte die Diffusion von Abfallprodukten und Nährstoffen in den Gelen.³⁹ Durch die Kontrolle der Vernetzungsreaktion eines Hydrogels lassen sich also dessen Eigenschaften direkt beeinflussen.^{120,121} Außerdem bestimmt die Vernetzungsreaktion über den Einsatz in verschiedenen 3D Biodrucktechnologien.

Wie oben bereits beschrieben, sind nicht nur die biologischen und chemischen Eigenschaften eines Hydrogels vor, während und nach dem Druckprozess von Bedeutung, sondern auch dessen viskoelastische Eigenschaften. Besonders für den extrusionsbasierten 3D Biodruck viskoser Materialien ist ein scherverdünnendes Verhalten vorteilhaft (Abbildung 4).

1.3.3 Rheologie

Die Rheologie untersucht und beschreibt das Deformations- und Fließverhalten von Materialien. Sie analysiert die Deformation von festkörperähnlichen Materialien und das Fließverhalten von flüssigkeitsähnlichen Materialien, ebenso das Verhalten von komplexen viskoelastischen Materialien, die Eigenschaften von Festkörpern und Flüssigkeiten aufweisen.^{54,122} Mit den rheologischen Eigenschaften können zum Einen die Stabilität von Hydrogelen beurteilt werden, zum Anderen lassen sich Aussagen darüber treffen, ob ein Material für eine bestimmte Drucktechnologie überhaupt geeignet ist.⁶ Die viskoelastischen Eigenschaften Speicher- und Verlustmodul lassen eine Einordnung der mechanischen Stabilität zu und die Beschreibung der Scherviskosität und der Fließgrenze gibt Hinweise darauf, für welche Drucktechnologien das Material eingesetzt werden kann.⁶ Die rheologischen Eigenschaften eines polymeren Materials werden unter anderem durch die Polymerkonzentration beeinflusst. Da eine hohe Polymerkonzentration die Viabilität, Proliferation und Migration negativ beeinflussen kann, werden im *Tissue Engineering* Polymere mit hohem Molekulargewicht in niedriger Konzentration eingesetzt.⁵¹ Die häufig verwendeten Biopolymere weisen ein deutlich ein höheres Molekulargewicht als die synthetische Polymere auf und führen auch in geringen Konzentrationen zu viskosen Materialien.¹²³ Besonders für den am häufigsten eingesetzten extrusionsbasierten 3D Biodruck ist eine hohe Viskosität von entscheidender Bedeutung, da sie die Stabilität der gedruckten Struktur bis zur chemischen Vernetzung stabilisiert. Bei Verwendung eines

thermosensitiven Biopolymers wie Gelatine kann die Viskosität mit der Temperatur beeinflusst werden, dadurch sind Gelatine-basierte Hydrogele in Drucktechnologien, welche unterschiedliche Viskositäten erfordern, einsetzbar.^{23,124} Mit den viskoelastischen Eigenschaften lassen sich auch die physikalischen und chemischen Vernetzungsvorgänge evaluieren. So kann durch Messen des Speicher- und Verlustmoduls zum Beispiel die Geliertemperatur eines Materials bestimmt werden, sowie bestätigt werden, dass der Vernetzungsvorgang zu einem Gel geführt hat. Feststoff-ähnliche Materialien zeigen einen höheren Speichermodul wie Verlustmodul.^{54,125} Die Bestimmung der Geliertemperatur bietet eine erste Einordnung, in welchem Bereich die Temperatur der Tinte beim extrusionsbasierten Drucken liegen sollte. Weitere wichtige Eigenschaften, welche durch die Rheologie untersucht werden, sind die Scherviskosität und die Fließgrenze.¹²⁵ Die Scherviskosität (Abbildung 4, Kapitel 1.2.1.1) beschreibt, ob sich die Viskosität mit der Scherung der Probe verändert.⁵³ Für den extrusionsbasierten 3D Biodruck sind scherverdünnende Materialien besonders geeignet, da sie eine Extrusion von Zellen durch feine Nadelöffnungen ermöglichen.⁶ Die Fließgrenze gibt an, ab welcher einwirkenden mechanischen Kraft das Polymernetzwerk zerstört wird und die Probe zu fließen beginnt.⁵⁴ Bei Materialien mit Festkörperverhalten, kann mit der Fließgrenze beurteilt werden, wann die Netzwerkstruktur zerstört wird. Oberhalb der Fließgrenze kann die Viskosität einer Probe bestimmt werden.¹²⁵ Im Hinblick auf das Drucken von chemisch vernetzten Hydrogelen, kann also die Kraft bestimmt werden, ab welcher die kovalenten Bindungen zerstört werden. Beim Verdrucken von physikalisch vernetzten Hydrogelen wie Gelatine, Alginate und Agarose gibt die Fließgrenze einen weiteren Hinweis auf die Stärke der Vernetzung. Je höher die Fließgrenze, umso mehr Kraft wird zur Zerstörung der Vernetzung benötigt und desto stärker ist sie.^{125,126} Die Messung der rheologischen Eigenschaften erfolgt in der Regel unter Zerstörung der Probe mit einem Platte-Platte-Rheometer (Abbildung 8 (links)). Die zu untersuchende Probe wird auf den Probenhalter gegeben und die Messplatte auf die Probe gefahren. Durch Rotation oder Oszillation der Messplatte können die rheologischen Eigenschaften der Probe bestimmt werden.¹²⁵ Da die kontaktlose Untersuchung von Materialien im Bereich des *Tissue Engineering* von großer Bedeutung im Hinblick auf die Generierung von Implantaten ist, beschäftigen sich Forscher zunehmend mit kontaktlosen Analysen, die die Probe nicht zerstören.^{127,128} Die Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften von weichen Materialien ist mittlerweile kontaktlos möglich. Mit der Messtechnologie des ElastoSens Bio (Rheolution Inc.) (Abbildung 8 (rechts)) können der Speichermodul G' von weichen Materialien, der Verlustmodul G'' und der Verlusttangens von festeren Materialien gemessen werden.¹²⁹

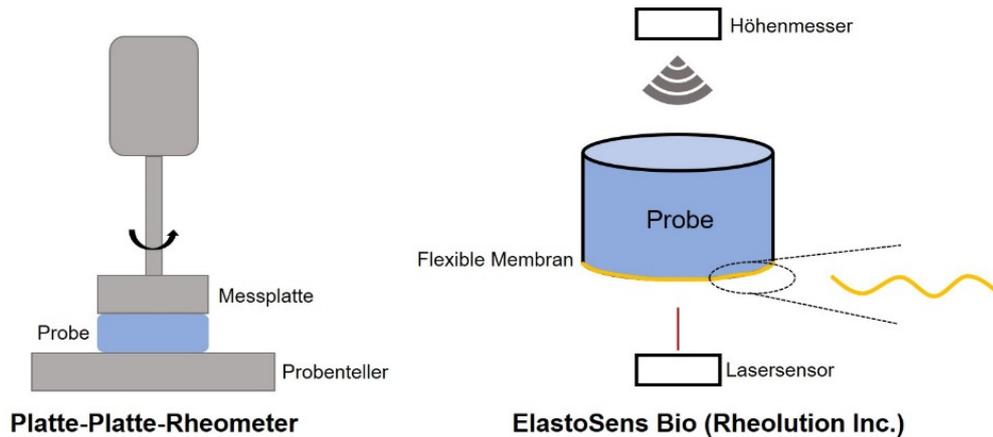


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Platte-Platte-Rheometers (links) und der kontaktlosen Messtechnologie des ElastoSens Bio (rechts). Modifiziert nach S. Haase, Rheolution Inc.^{129,130}

Die Messung mit dem ElastoSens Bio erfolgt durch Anbringen von Vibrationen an den Probenhalter, wodurch die Probe und die Membran ausgelenkt wird. Aus den bekannten viskoelastischen Eigenschaften der Membran, dem Probenvolumen und der Auslenkung der Membran können die viskoelastischen Eigenschaften der Probe berechnet werden.¹²⁹

Für den Aufbau von Gewebemodellen ist neben den Eigenschaften des verwendeten Materials und der korrekten Funktion von Zellen die Anordnung von großer Bedeutung. Dies kann wie bereits beschrieben durch 3D Biodruck erreicht werden. Um die Mikroumgebung von Zellen unter fluidischen Bedingungen zu simulieren kommen *Organ-on-a-chip* Systeme zum Einsatz.¹³¹

1.4 Organ-on-a-chip Systeme

Der Aufbau von artifiziellen Geweben erfordert die korrekte Anordnung von gewebespezifischen Zellen, aber auch die Simulation von dynamischen Prozessen im Gewebe. Hierzu gehört zum Beispiel die Simulation der Durchblutung, welche die Zellen versorgt. Durch artifizielle Blutgefäße in den künstlichen Geweben kann außerdem die Fluidodynamik simuliert werden.¹³² *Organ-on-a-chip* Systeme bestehen häufig aus Polycarbonat (PC). Ihr Aufbau beinhaltet zwei Kompartimente, eines zur Simulation eines Blutgefäßes, welches durch eine dünne Folie von dem zweiten Kompartiment getrennt ist. Das zweite Kompartiment dient dem Aufbau des umliegenden Gewebes. Die Simulation des Blutstromes erfolgt durch den Anschluss an ein Pumpensystem, worüber das Gewebe mit Nährstoffen versorgt wird und die Zellen gleichzeitig dynamischen Kräften ausgesetzt sind. Mit *Organ-on-a-chip* Systemen konnten bereits Modelle von Leber, Lunge und Herz generiert werden.¹³³⁻¹³⁵ Diese Modelle können zum Screening von Wirkstoffkandidaten oder der Simulation von pathologischen Prozessen genutzt werden. Durch die simulierte Durchblutung bilden diese Modelle Gewebe gut nach. Prozesse, welche in und an Blutgefäßen ablaufen, wie zum Beispiel der transendotheliale Transport von Molekülen, können mit diesen Modellen

beobachtet werden und es können dann Aussagen über die Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffes getroffen werden. Im Arbeitskreis von Prof. Dr. Ute Schepers am Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) wurde ein *Organ-on-a-chip* System aus PC entwickelt. Der Chip besteht aus einem halbrunden Kanal aus einer PC-Folie und einem darunterliegenden Kompartiment. Der Kanal dient der Simulation eines Blutgefäßes. Dazu wird dieser im Inneren mit Endothelzellen besiedelt und der Blutfluss durch den Anschluss an ein mikrofluidisches Pumpensystem simuliert.¹³⁶ Durch Besiedelung der Außenseite des Kanals und des zweiten Kompartimentes können gewebespezifische Zellen eingebracht werden.¹³⁶ Durch die Verwendung von Hydrogelen können die gewebespezifischen Zellen im Chip 3D kultiviert werden. Die Herstellung des Chips erfolgt mit dem SMART (*Substrate Modifikation and Replication After Thermoforming*) Verfahren (Abbildung 9).¹³⁶ Bei diesem Verfahren wird eine mit Schwerionen beschossene PC-Folie durch Thermoformen in die halbrunde Form des Mikrokanals gebracht und durch nasschemisches Ätzen Poren in der Folie erzeugt. Durch das Ätzen bilden sich an den Kollisionsstellen der Schwerionen mit der Folie Poren, diese stellen die Diffusion von Nährstoffen in das umgebende Kompartiment sicher. Die poröse Folie wird durch Laserschweißen auf dem PC-Chip fixiert und das Kompartiment mit einem Deckglas verschlossen. Der verschlossene Chip kann dann mit Endothel- und gewebespezifischen Zellen besiedelt werden und durch ein mikrofluidisches Pumpensystem perfundiert werden.¹³⁶

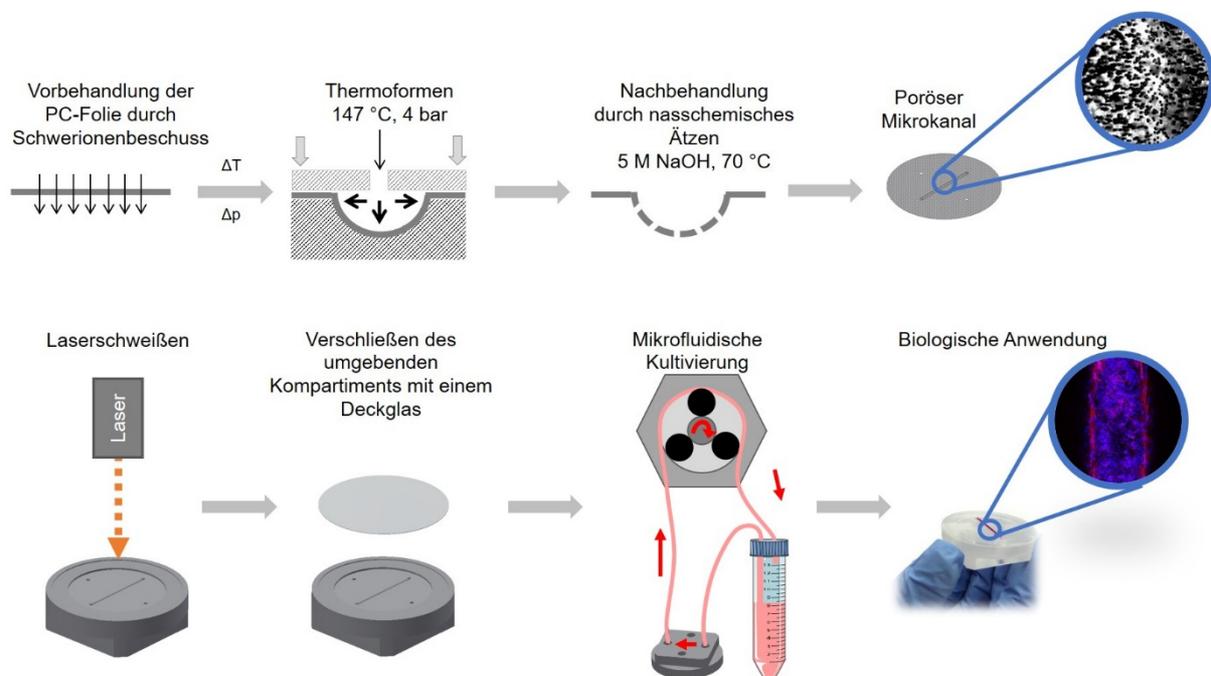


Abbildung 9: Herstellung und Assemblierung eines Organ-on-a-chip Systems aus Polycarbonat zum Aufbau von perfundierbaren Gewebemodellen. Modifiziert nach Kappings et al.¹³⁶

Als Alternative zu *Organ-on-a-chip* Systemen aus harten polymeren Materialien wie PC können auch Gewebemodelle mit 3D Biodruck erzeugt werden, welche vollständig aus

weichen Materialien bestehen. Die Generierung des Blutgefäßes erfolgt dabei durch Hohlstrukturen im weichen Material ohne den Einsatz von festen Stützstrukturen. Diese Modelle können von einer Vorrichtung umgeben sein, die den Anschluss an ein mikrofluidisches Pumpensystem ermöglicht. Im Unterschied zu den *Organ-on-a-chip* Systemen besteht das simulierte Gewebe ausschließlich aus zum Gewebe passenden Materialien, eine Besiedelung fester Materialien mit Zellen erfolgt hier nicht.^{137,138} Durch das Fehlen von festen, unnatürlichen Materialien kann auf aufwendige Beschichtungsvorgänge verzichtet werden und die erhaltenen Gewebe sind potentiell zur Implantation geeignet.

1.4.1 Blutgefäße

Blutgefäße gehören zu den wichtigsten zu simulierenden Komponenten, sie durchziehen alle Gewebe und Organe und versorgen diese mit Nährstoffen und befördern verschiedene biologisch aktive Moleküle wie Wachstumsfaktoren und Proteine an ihren Bestimmungsort. Zusätzlich spielen sie eine große Rolle bei der Bildung und Entwicklung von Organen, bei der Wundheilung und bei entzündlichen Prozessen.¹³⁹⁻¹⁴¹ Blutgefäße sind im Allgemeinen mit einer Schicht Endothelzellen ausgekleidet, welche unter anderem den Stoffaustausch zwischen dem Blut und dem umliegenden Gewebe steuern.¹⁴² Die gewebespezifischen Zellen und die extrazelluläre Matrix umgeben die Blutgefäße und bilden das jeweilige Gewebe. Die Nachbildung von Blutgefäßen ist essentiell, da nur dadurch eine *in vivo* Situation in dem artifiziellen Gewebe nachgebildet werden kann.¹³⁸ Der Anschluss der artifiziellen Blutgefäße an ein mikrofluidisches System simuliert den Blutfluss im Gewebemodell. Im Hinblick auf eine Implantation sind Blutgefäße von Relevanz, da sie selbst als Implantat fungieren können, zum Beispiel als Ersatz für Blutgefäße mit Durchmessern kleiner als 6 mm, da diese nicht durch Stents stabilisiert werden können.¹⁴³

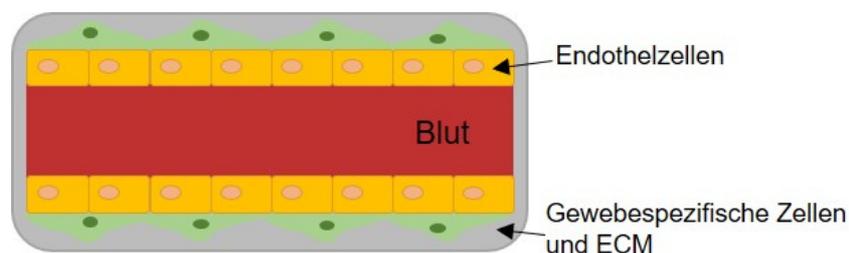


Abbildung 10: Vereinfachte, schematische Darstellung eines Blutgefäßes. Endothelzellen kleiden das von gewebespezifischen Zellen umgebene Blutgefäß aus. Modifiziert nach Alberts et al.¹⁴²

2 Zielsetzung

Zum Aufbau von artifiziellen Geweben ist neben der Verwendung der gewebespezifischen Zellen auch das Vorhandensein eines geeigneten Materials, welches die ECM gut simuliert, von entscheidender Bedeutung. Ein geeignetes Material muss unter physiologischen Bedingungen stabil sein, darf nicht toxisch auf die eingekapselten Zellen wirken und muss den Zellen ihre natürliche Funktion ermöglichen. Die Entwicklung eines solchen biokompatiblen Materials war das Ziel dieser Arbeit. Auf Basis von Gelatine sollten stabile Hydrogele entwickelt werden, welche aus Photopolymeren mit oder ohne Vernetzer durch eine lichtinduzierte Vernetzungsreaktion erhalten werden. Der Fokus lag dabei zunächst auf der Charakterisierung der einzelnen Komponenten bezüglich Toxizität und auf der Evaluierung der Biokompatibilität. Da der Aufbau von Gewebemodellen außerdem eine hohe Präzision erfordert, sollten die entwickelten Materialien für die Verarbeitung in unterschiedlichen 3D Biodrucktechnologien geeignet sein. Um dies festzustellen, sollten zunächst geeignete Druckparameter bestimmt werden und in einem zweiten Schritt die Zellverträglichkeit der Druckparameter untersucht werden. Mit den synthetisierten Hydrogelen sollte außerdem ein Druckprozess entwickelt werden, der es ermöglicht ein Gewebemodell auf einem Polycarbonatsubstrat aufzubauen. Abschließend sollte ein Druckprozess entwickelt werden, welcher es ermöglicht, Kanalstrukturen ohne feste Substrate wie Polycarbonat zu drucken.

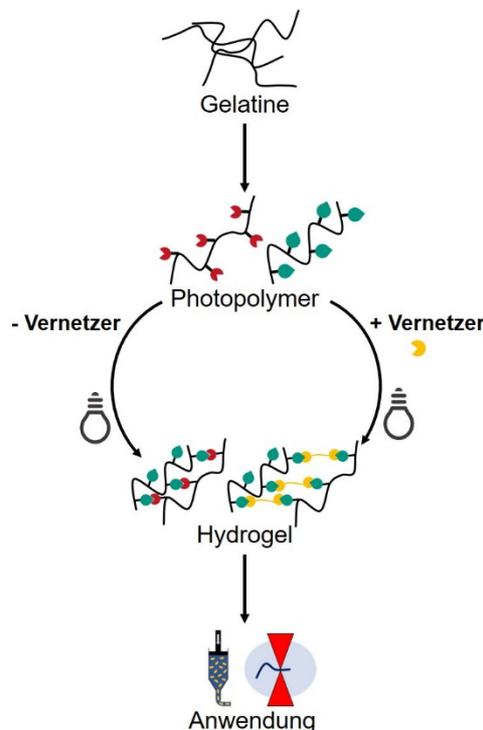


Abbildung 11: Durch chemische Funktionalisierung von Gelatine sollten Photopolymere erhalten werden, welche sich lichtinduziert zu einem Hydrogel kovalent vernetzen lassen. Durch die Kombination zweier Photopolymere oder eines Photopolymers mit einem Vernetzer sollten stabile Hydrogele erzeugt werden, die nach umfassender Charakterisierung in unterschiedlichen 3D Biodrucktechnologien zur Anwendung als Biotinte kommen sollten.

3 Ergebnisse I – Hydrogele ohne Vernetzer

Die Generierung von artifiziellem Gewebe stellt die Forscher im *Tissue Engineering* vor große Herausforderungen. Die künstlichen Gewebe sollen die *in vivo* Gegebenheiten möglichst genau nachbilden. Hierzu gehört neben der korrekten Anordnung der Zellen auch die Nachahmung der extrazellulären Matrix. Die ECM umgibt jede einzelne Zelle eines Organismus.¹⁴⁴ Sie verleiht dem Gewebe mechanische Stabilität, beeinflusst aber auch die Entwicklung eines Gewebes, die Differenzierung, Proliferation und Migration der enthaltenen Zellen. Zusätzlich ist sie an der Funktion von Zellen und Geweben beteiligt.¹⁴⁵ Um all diese Eigenschaften nachzubilden, ist ein biokompatibles Material erforderlich, das bioabbaubar und gleichzeitig stabil ist. Nährstoffe, Gase und Zellsignalstoffe müssen das Material ungehindert durchdringen können. Des Weiteren muss das Material über Zellinteraktionsdomänen verfügen.^{146,147} Um zu gewährleisten, dass die Gewebemodelle reproduzierbar sind, muss das als Umgebungsmatrix verwendete Material in seinen Eigenschaften konsistent sein. Neben den oben genannten Eigenschaften gehören hierzu auch die Eigenschaften, die für den Aufbauprozess des Gewebes von entscheidender Bedeutung sind. Besonders beim Aufbau von Geweben mit 3D Druck sind neben den Anforderungen der Zellen auch die physikalischen Eigenschaften eines Materials von Interesse.¹ Besonders Hydrogele eignen sich für den Einsatz als artifizielle ECM, da ihre Polymerstruktur der natürlichen ECM ähnelt, ebenso ihr Wassergehalt und ihre mechanischen Eigenschaften.^{86,147} Gelatine-basierte Hydrogele haben sich für den Einsatz im Tissue Engineering als besonders vielversprechend erwiesen. Gelatine wird aus Kollagen I durch saure (Gelatine Typ A) oder basische (Gelatine Typ B) Hydrolyse gewonnen.¹⁴⁸ Kollagen I ist das strukturgebende Protein in Haut- und Knorpelgewebe.¹⁴⁹ Nach abgeschlossener Hydrolyse wird die Gelatine extrahiert. Die hierbei herrschende Temperatur beeinflusst die Gelierkraft der erhaltenen Gelatine. Je höher die Temperatur in diesem Schritt, umso geringer ist die Gelierkraft.¹⁵⁰ Die Gelierkraft von Gelatine wird mit der sogenannten Bloom-Zahl angegeben.¹⁵¹ Typischerweise hat Gelatine aus Schweinehaut eine Bloom-Zahl zwischen 50 und 300 Bloom.¹⁵⁰ Die für die Synthese in dieser Arbeit verwendete Gelatine Typ A (Sigma Aldrich Chemie) aus Schweinehaut wies eine Bloom-Zahl von 300 Bloom auf (Herstellerangabe). Da Gelatine aus Kollagen, einem natürlichen Bestandteil der ECM, gewonnen wird, ist sie biokompatibel, verfügt über Protease-Schnittstellen und besitzt natürliche Zell-Interaktionsdomänen.^{1,152} Durch die Bildung von Triplehelices bildet Gelatine bei Temperaturen unter 24 °C eine feste Gelstruktur, die jedoch bei physiologischen Temperaturen nicht stabil ist. Die Tertiärstruktur denaturiert bei diesen Temperaturen.¹⁵³ Durch die Modifikation von Gelatine, zum Beispiel durch Funktionalisierung bestimmter Seitenketten mit photoreaktiven Gruppen, können die Gelatineketten durch eine Photoreaktion kovalent vernetzt werden und ein bei 37 °C stabiles Hydrogel ausbilden.¹⁵³

3.1 Synthese und Charakterisierung der Photopolymere

Zur Erzeugung eines unter physiologischen Bedingungen stabilen Hydrogels aus Gelatine wurde diese mit verschiedenen photoreaktiven Gruppen zur drei Photopolymeren modifiziert. In enger Zusammenarbeit mit Sonja Haase und Tobias Göckler wurden im Rahmen des 3D BioNet Projektes zwei Hydrogelsysteme, basierend auf funktionalisierter Gelatine, entwickelt und charakterisiert (Kapitel 3.1 und Kapitel 3.2). Alle Partner partizipierten zu gleichen Teilen und die Ergebnisse wurden bereits publiziert.¹⁵⁴

3.1.1 Analyse der verwendeten Gelatine

Die zur Synthese der Photopolymere verwendete Gelatine wurde vor Beginn der Synthese umfassend analysiert. Der Fokus lag hierbei auf der Bestimmung der freien Aminogruppen, die für die Funktionalisierung genutzt wurden.

Die zu funktionalisierenden primären Aminogruppen befinden sich an den Seitenketten der Aminosäuren *L-Lysin* und *L-Hydroxylysin*, welche durchschnittlich etwa 4 % der Primärsequenz von Gelatine ausmachen.¹⁵⁵ In Abbildung 12B ist die Zusammensetzung von Gelatine gezeigt. Die am häufigsten vorkommende Aminosäure in Gelatine ist Glycin (Gly), die mit Prolin (Pro) und Hydroxyprolin (HPro) das Hauptmotiv, die Aminosäuresequenz Gly-Pro-HPro, bildet. Dieses Hauptmotiv sorgt dafür, dass sich die einzelnen Helices zu einer Tertiärstruktur in Form von Triplehelices zusammenlagern können.¹⁵⁶

Mit dem TNBSA-Assay wurde der durchschnittliche Gehalt an primären Aminogruppen pro Gramm Gelatine ermittelt. Bei dem colorimetrischen Assay reagiert Trinitrobenzolsulfonsäure (engl.: *Trinitrobenzenesulfonic acid*, TNBSA) mit primären Aminogruppen zu einem gelben Derivat, dessen Absorption bei 335 nm bestimmt werden kann (Abbildung 12A).

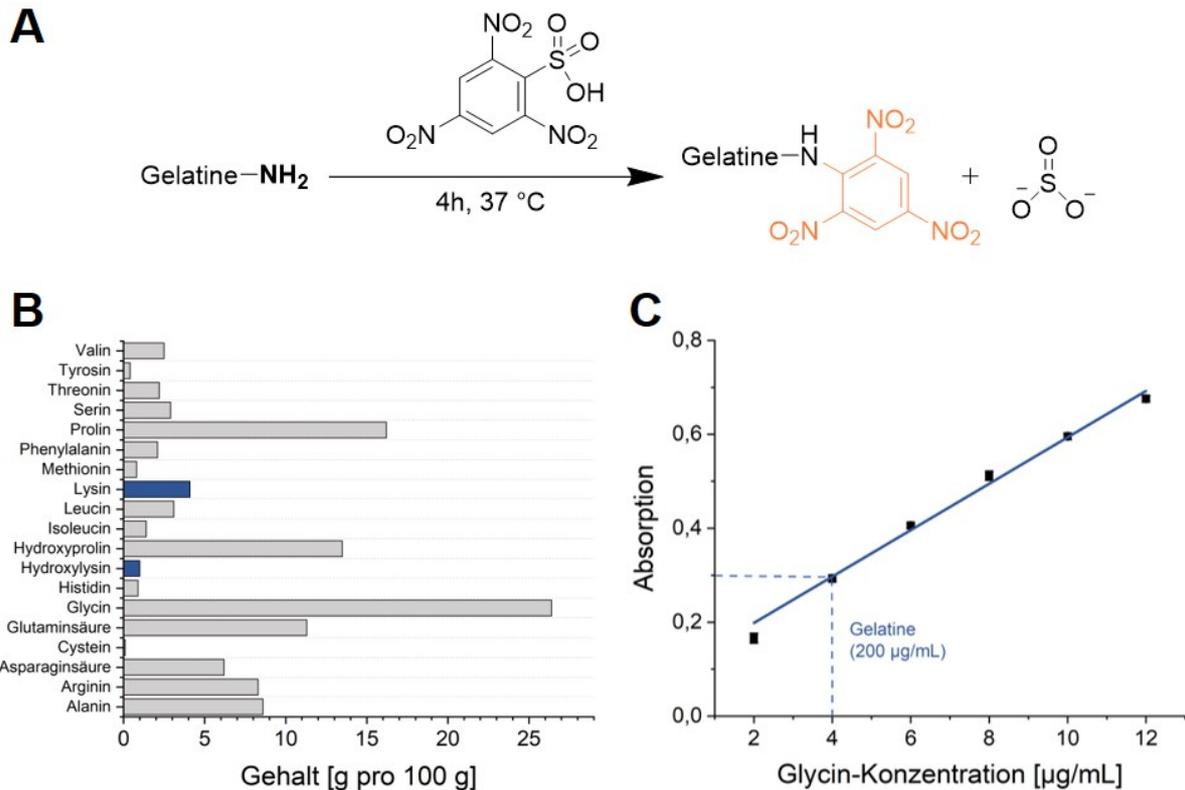


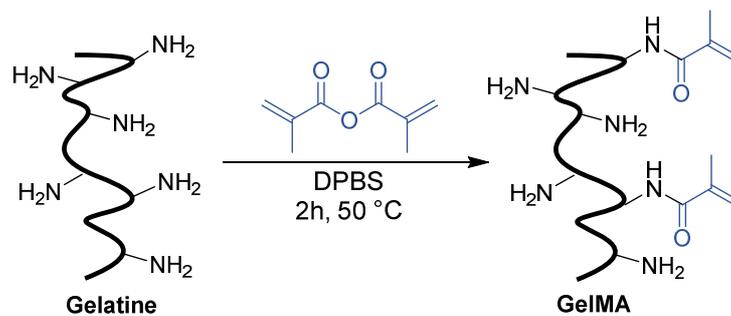
Abbildung 12: TNBSA-Assay zur Bestimmung der Stoffmenge freier Aminogruppen pro Gramm Gelatine. (A) Reaktion von TNBSA mit Gelatine. (B) Zusammensetzung von Gelatine. (C) Standardkurve zur Bestimmung der freien Aminogruppen in Gelatine. Modifiziert nach T. Göckler.¹⁵⁷

Aus Glycin-Lösungen verschiedener Konzentrationen (2-12 µg/ml) wurde eine Standardkurve (Abbildung 12C) erstellt, welche es später ermöglichte die Stoffmenge primärer Aminogruppen in der Gelatine zu bestimmen. Es zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Glycin-Konzentration und der Absorption. Mit den Absorptionswerten der Gelatinederivate konnte daraus die Stoffmenge primärer Aminogruppen pro Gramm Gelatine bestimmt werden. Die Stoffmenge primärer Aminogruppen in der verwendeten Gelatine betrug $0,266 \pm 0,04$ mmol/g und entsprach dem aus der Literatur bekannten Wert ($0,268$ mmol/g).¹⁵⁸

3.1.2 GelMA

Reine Gelatine eignet sich nicht für den Einsatz unter physiologischen Bedingungen, da die Tertiärstruktur, die dem Gel die Festigkeit verleiht, bei 37 °C nicht stabil ist. Um zu erreichen, dass gelatine-basierte Hydrogele auch bei 37 °C stabil sind, wurde Gelatine mit Methacrylatgruppen modifiziert.⁹⁹ Durch die Einführung der Methacrylatgruppen an den Seitenketten von Lysin und Hydroxylysin konnte erreicht werden, dass sich die einzelnen Ketten der Gelatine durch Zugabe eines Photoinitiator und der Bestrahlung mit Licht zu einem kovalenten Netzwerk vernetzen ließen. Das erhaltene Gelatinemethacrylamid (GelMA) ist der aktuelle Goldstandard beim Einsatz von semi-synthetischen Hydrogelen in der 3D Zellkultur. Es vereint die Eigenschaften des natürlichen Hydrogels Gelatine mit denen eines

synthetischen Hydrogels.⁹⁹ Die in der Gelatine enthaltenen Zellinteraktionsdomänen, wie die RGD-Domäne, bleiben erhalten. Die RGD-Domäne besteht aus dem Aminosäuremotiv Arginin-Glycin-Asparaginsäure. Durch seine spezielle Faltung können Zellen über Integrinrezeptoren an diese Domäne binden und damit am Hydrogel adhären.¹⁵⁹ Zusätzlich fungiert die RGD-Domäne als Signalvermittler zwischen Matrix und Zelle, wodurch die Proliferation und Polarisation der Zellen beeinflusst werden. Durch den synthetischen Anteil wird die mechanische Stabilität des Hydrogels chemisch kontrollierbar. Das Funktionalisieren der primären Aminogruppen mit Methacrylsäureanhydrid (MAA) ermöglicht es, die Gelatineketten durch eine lichtinduzierte Reaktion kovalent zu vernetzen. Dadurch wird die Stabilität des Hydrogels bestimmt und bei 37 °C gewährleistet. Die Synthese von GelMA erfolgte nach Van den Bulcke *et al.*¹¹⁹ In Zusammenarbeit mit Sonja Haase und Tobias Göckler (beide IFG, KIT) wurde die Synthese an die eingesetzte Gelatine angepasst und optimiert.^{130,157} Ziel war es, drei verschieden stark funktionalisierte GelMA zu erhalten. Das Reaktionsschema ist in Schema 2 gezeigt.



Schema 2: Synthese von GelMA durch Funktionalisierung von Gelatine mit MAA. MAA reagiert in einer nukleophilen Acylsubstitution mit den primären Aminogruppen der Gelatine zu GelMA.

Die Stoffmenge freier Aminogruppen pro Gramm Gelatine betrug 0,266 mmol/g und entsprach 1 Äq. Die Synthese wurde mit verschiedenen Mengen MAA (1 Äq., 8 Äq., 20 Äq.) durchgeführt. Die Auswahl der eingesetzten Menge MAA ergab sich aus bereits publizierten Protokollen.^{130,154,157} 1 g Gelatine wurde in 10 ml DPBS⁻ gelöst und das MAA langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 2 Stunden bei 50 °C gerührt, verdünnt und für 7 Tage gegen ddH₂O dialysiert. Die Lösung wurde lyophilisiert und der erhaltene weiße Feststoff bei -20 °C gelagert. Mit dem TNBSA-Assay wurden die Funktionalisierungsgrade der erhaltenen Produkte bestimmt. Die Bestimmung erfolgte indirekt über die noch vorhandenen primären Aminogruppen und den Vergleich der Absorptionen der Syntheseprodukte mit der Absorption von reiner Gelatine. Die Berechnung erfolgte wie in Kapitel 6.8.1 gezeigt. In Abbildung 13 sind die erhaltenen Funktionalisierungsgrade gezeigt.

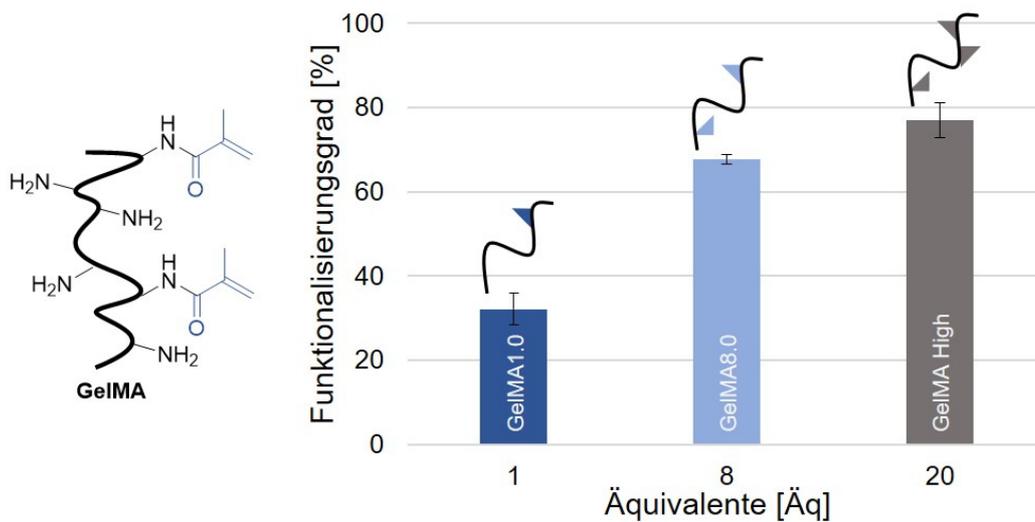


Abbildung 13: Funktionalisierungsgrade von GelMA. Zu 1 g Gelatine wurde 1 Äq., 8 Äq., und 20 Äq. MAA gegeben. Der Funktionalisierungsgrad wurde mit dem TNBSA-Assay bestimmt. Für GelMA1.0 wurde ein Funktionalisierungsgrad von 36 % erhalten, für GelMA8.0 67 % und für GelMA High 78%. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten.

Durch den Einsatz von 1 Äq. MAA wurde ein Funktionalisierungsgrad von 36 % erhalten. Der Funktionalisierungsgrad ließ sich durch den Einsatz von 8 Äq. Und 20 Äq. auf 67 % und 78 % steigern. Die Hydrogele werden im Folgenden als GelMA1.0, GelMA8.0 und GelMA *High* bezeichnet. Der Erfolg der Synthese konnte auch durch ¹H-NMR bestätigt werden (Abbildung 14).

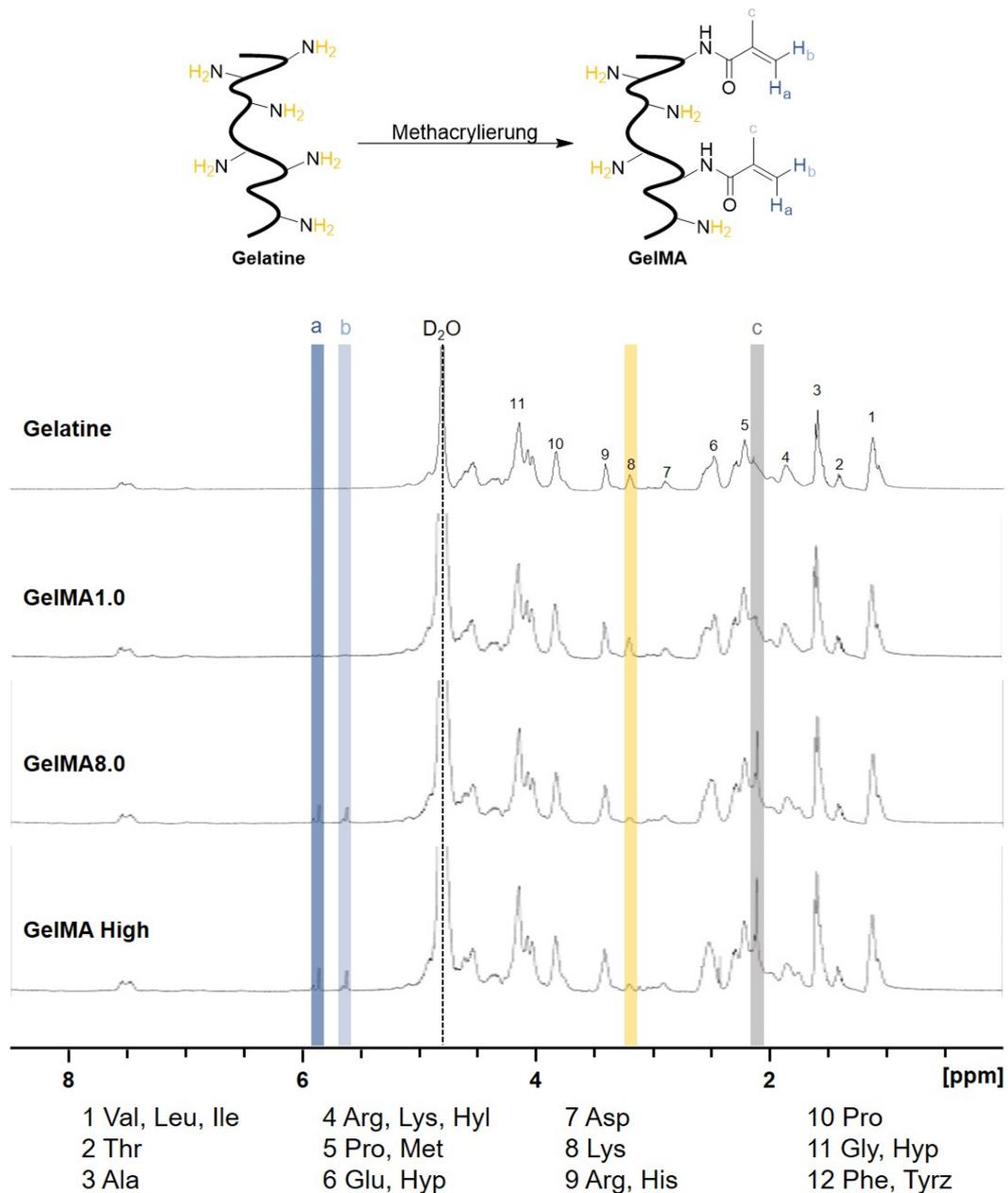
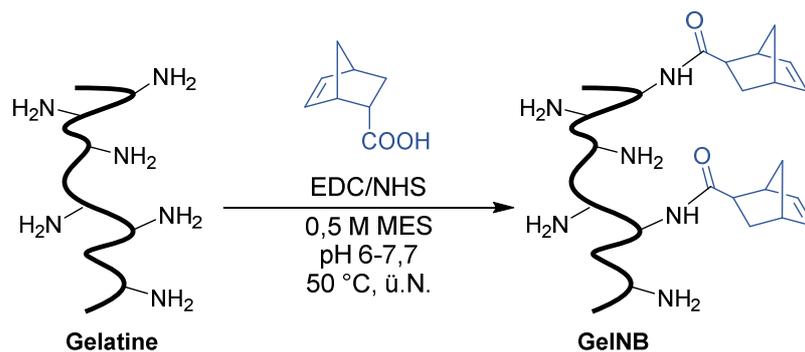


Abbildung 14: $^1\text{H-NMR}$ Spektren von Gelatine, GelMA1.0, GelMA8.0 und GelMA High. Die Protonen der Methacryloylgruppe sind in blau und grau dargestellt, die der NH_2 -Gruppen in gelb. Mit den Zahlen 1-12 sind die Zuordnungen einzelner Aminosäuren dargestellt. Die Messung erfolgte bei 40°C in D_2O bei 400 Hz.

Die Proben wurden in D_2O gelöst und während der Messung auf 40°C erwärmt, um ein Gelieren zu verhindern. Die Signale bei 5,4 und 5,8 ppm sind den Vinylprotonen zuzuordnen, die Signale bei 2,2 ppm denen der Methacrylatgruppe. Diese Signale sind nur in den funktionalisierten Proben erkennbar. Reine Gelatine weist diese Signale nicht auf. Mit Zunahme der Funktionalisierung zeigt sich eine erkennbare Abnahme der Signalintensität der den NH_2 -Gruppen zuzuordnenden Signale bei 3,1 ppm, was die erfolgreiche Funktionalisierung ebenfalls bestätigte.

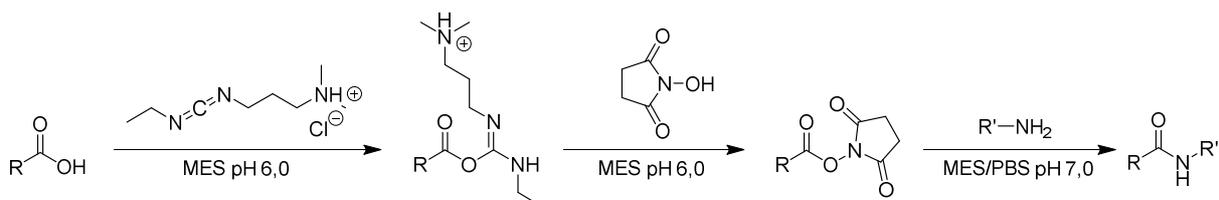
3.1.3 GelNB

Die Vernetzung des Photopolymers GelMA zum Hydrogel durch die Photoreaktion zweier Doppelbindungen erfolgt mit einer radikalischen Kettenpolymerisation. Über diese ist bekannt, dass sie sich negativ auf Zellen auswirken kann.¹⁶⁰ Zusätzlich ist es möglich, dass zwei Doppelbindungen reagieren, die sich auf einer Gelatinekette befinden. Dies führt zu einer inhomogenen und instabilen Netzwerkstruktur.^{161,162} Um diese beiden Probleme zu umgehen, wurde ein weiteres Photopolymer hergestellt. Durch die Funktionalisierung von Gelatine mit Norbornen zum Photopolymer GelNB lässt sich diese nach Zugabe eines Thiols und eines Photoinitiators durch eine Thiol-En-Reaktion zum Hydrogel vernetzen. Da die Thiol-En-Reaktion dem Mechanismus einer Stufenpolymerisation folgt, werden weniger freie Radikale für die Reaktion benötigt und damit das Risiko für Zellschäden geringer.^{85,163} Die Funktionalisierung der primären Aminogruppen der Gelatine erfolgte mit Methoden der Peptidchemie. Hierzu wurde Norbornencarboxylsäure mit Hilfe von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid (EDC-HCl) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) zur Reaktion mit der Gelatine gebracht. Die Reaktion ist in Schema 3 gezeigt.



Schema 3: Synthese von GelNB. Mit Methoden der Peptidchemie wurde Gelatine mit Norbornen funktionalisiert. Nach Aktivierung der Norbornencarboxylsäure mit EDC-HCl und NHS reagiert diese über Nacht mit den primären Aminogruppen der Gelatine zum Photopolymer GelNB.¹⁵⁴

Wie aus der Peptidchemie bekannt ist, müssen Carbonsäuren vor der Reaktion mit primären Aminen aktiviert werden. Hierzu wurde die in MES-Puffer gelöste Norbornencarboxylsäure mit EDC-HCl und NHS versetzt und bei pH 6 aktiviert. NHS diente hierbei zur Stabilisierung des Aktivesters. Die Aktivierungsreaktion ist in Schema 4 gezeigt.¹⁶⁴



Schema 4: Aktivierung der Norbornencarboxylsäure mit EDC-HCl. Die Stabilisierung des Aktivesters erfolgte durch NHS. Modifiziert nach Thermo Fisher.¹⁶⁴

Nach der Aktivierung wurde die Gelatine zugegeben und der pH-Wert auf 7,7 erhöht. Die Lösung wurde über Nacht bei 40 °C gerührt und anschließend für 7 Tage gegen ddH₂O dialysiert. Das Produkt wurde nach dem Lyophilisieren als weißer Feststoff erhalten. Analog zur Synthese von GelMA wurden Synthesen mit unterschiedlichen Mengen Norbornencarbonsäure (0,3 Äq., 2 Äq. und 10 Äq.) durchgeführt um verschieden stark modifizierte Gelatine zu erhalten. Die Bestimmung des Funktionalisierungsgrades erfolgte indirekt über die noch vorhandenen primären Aminogruppen und den Vergleich der Absorptionen der Syntheseprodukte mit der Absorption von reiner Gelatine. Die Berechnung erfolgte wie in Kapitel 6.8.1 gezeigt. Die erhaltenen Funktionalisierungsgrade sind in Abbildung 15 gezeigt. Im Folgenden werden die Hydrogele als GelNB *Low*, GelNB *Medium* und GelNB *High* bezeichnet.

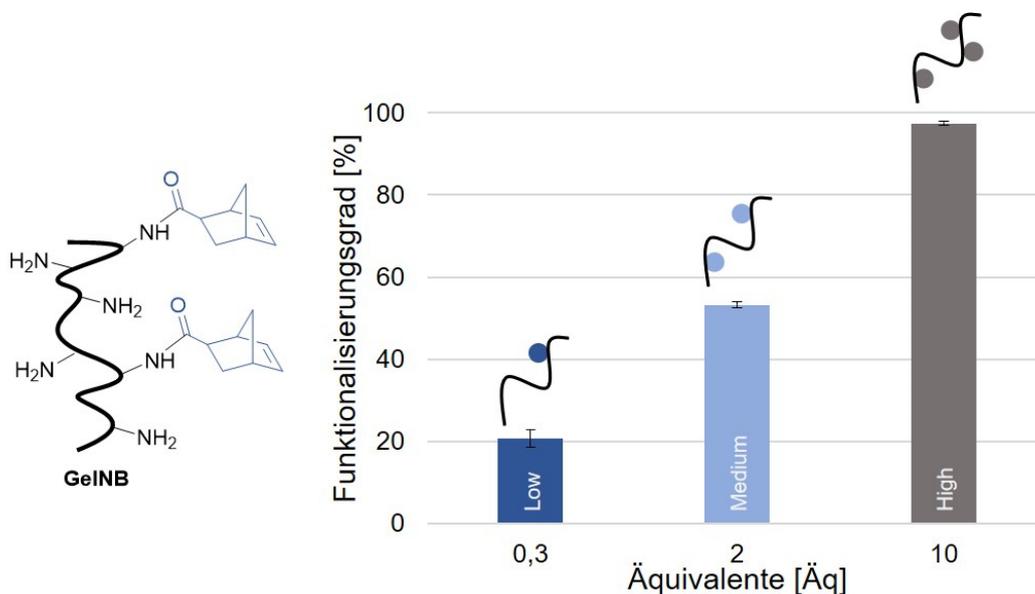


Abbildung 15: Funktionalisierungsgrade von GelNB. Die Synthese erfolgte mit 0,3 Äq., 2 Äq. und 10 Äq. Norbornencarboxylsäure. Die Bestimmung der Funktionalisierungsgrade erfolgte mit dem TNBSA-Assay. Für GelNB *Low* wurde ein Funktionalisierungsgrad von 20 % erhalten, für GelNB *Medium* 53 % und für GelNB *High* 97 %. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten.

Der Erfolg der Reaktion wurde mit ¹H-NMR bestätigt, die Spektren sind in Abbildung 16 gezeigt. Die Messung erfolgte in D₂O bei 40 °C um ein Gelieren während der Messung zu verhindern. Mit Zunahme des Funktionalisierungsgrades von Low < Medium < High nahm die Höhe des Signals bei 3,3 ppm, welches der Aminogruppe zugeordnet werden konnte, ab. Gleichzeitig nahm die Intensität der Signale der Norbornengruppe (3,2 ppm, 3,7 ppm, 6,2 ppm und 6,7 ppm) zu. Da die Norbornencarbonsäure als Gemisch aus der endo- und exo-Form vorlag, sollten diese Formen auch bei GelNB detektiert werden. In der Vergrößerung der Signale bei 6,35 ppm, 6,4 ppm und 6,7 ppm konnte dies bestätigt werden.

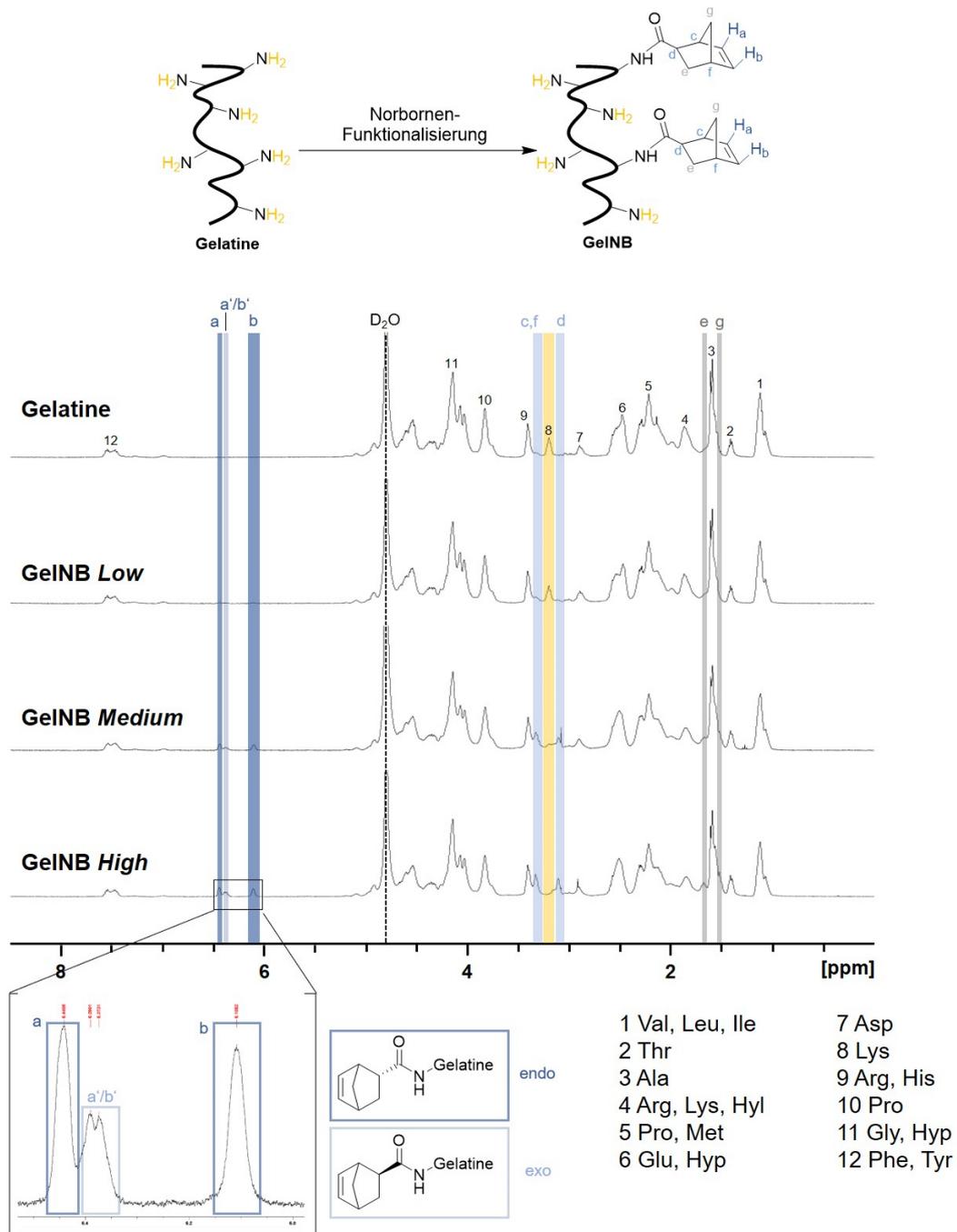


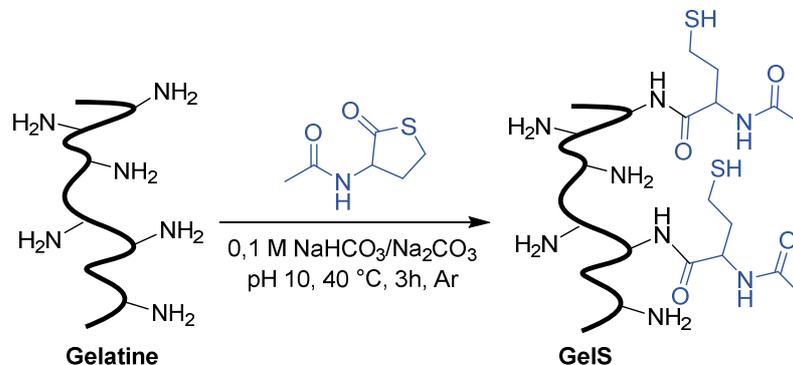
Abbildung 16: $^1\text{H-NMR}$ Spektren von Gelatine und GelNB. Die Messung erfolgte in D_2O bei $40\text{ }^\circ\text{C}$ und 400 Hz . Signale, die Aminosäuren zuzuordnen sind, sind von 1-12 nummeriert. Gelb hinterlegt sind die Signale der NH_2 -Gruppe, in blau und grau die der Norbornengruppe.

Der hier gezeigte Syntheseweg hat sich als erfolgreich erwiesen. Durch den Einsatz von EDC-HCl und NHS konnten Funktionalisierungsgrade von 12 % bis zu 97 % erreicht werden, was es erlaubt auf unterschiedliche Anforderungen verschiedener Gewebe zu reagieren, indem die Festigkeiten der Gele eingestellt werden können. Die Funktionalisierung von Gelatine mit Norbornengruppen wurde in der Literatur bereits beschrieben.¹⁶⁵ Durch Modifikation der Synthese von Tytgat *et al.* gelang es, auf DMSO als Lösungsmittel zu verzichten und die Synthese zu vereinfachen, sodass diese vollständig in wässriger Umgebung durchgeführt

werden konnte und eine aufwendige Reinigung des Produktes zur Entfernung von DMSO nicht mehr benötigt wurde.

3.1.4 GelS

Durch die Reaktion von *N*-Acetylhomocysteinthiolacton mit Gelatine wurde das Photopolymer GelS erhalten. GelS lässt sich ebenfalls durch Zugabe eines Photoinitiators über eine Thiol-En-Reaktion vernetzen. Als Reaktionspartner zur Vernetzung eignet sich zum Beispiel GelNB oder Vernetzer, die eine endständige Doppelbindung enthalten wie Polythylenglykoldiacrylat oder eine endständige Dreifachbindung, wie die in Schema 16 gezeigten Peptide. Bei der Umsetzung von Gelatine mit *N*-Acetylhomocysteinthiolacton zu GelS reagiert das Thiolacton in einer nukleophilen Acylsubstitution unter Ringöffnung mit den freien Aminogruppen der Gelatine.¹⁰⁰ In Schema 5 ist die Reaktion dargestellt.



Schema 5: Synthese von GelS. *N*-Acetylhomocysteinthiolacton reagiert mit den primären Aminogruppen unter Argonatmosphäre in einer nukleophilen Acylsubstitution zum Photopolymer GelS.

Die Reaktion erfolgte unter Schutzgasatmosphäre in entgastem Puffer (+EDTA), um eine Dimerisierung der Thiolgruppen zu verhindern. Zunächst wurde die Gelatine in entgastem Puffer gelöst und die Lösung dann mit verschiedenen Mengen Thiolacton versetzt. Die Lösung wurde für 3 Stunden bei 40 °C gerührt und anschließend für 24 Stunden gegen ddH₂O unter Schutzgasatmosphäre dialysiert. Das nach dem Lyophilisieren als weißer Feststoff erhaltene Produkt wurde bei -80 °C gelagert. Die hier angewendete Methode zur Thiolierung von Gelatine ist seit vielen Jahren für die Thiolierung von Biomolekülen bekannt und konnte von Vlierberghe *et al.* bereits erfolgreich für die Thiolierung von Gelatine genutzt werden.^{166,167} Die Bestimmung des Funktionalisierungsgrades erfolgte mit dem TNBSA-Assay wie oben beschrieben. Es wurden Funktionalisierungsgrade von 20 % und 50 % (Abbildung 17) erhalten. Eine Erhöhung des Funktionalisierungsgrades auf über 50 % konnte nicht erreicht werden. Dies entsprach der Erwartung, da aus der Literatur bekannt ist, dass mit zunehmender Thiolierung die Thiole mit den Aminogruppen der Gelatine als Nukleophile in Konkurrenz treten.¹⁶⁶

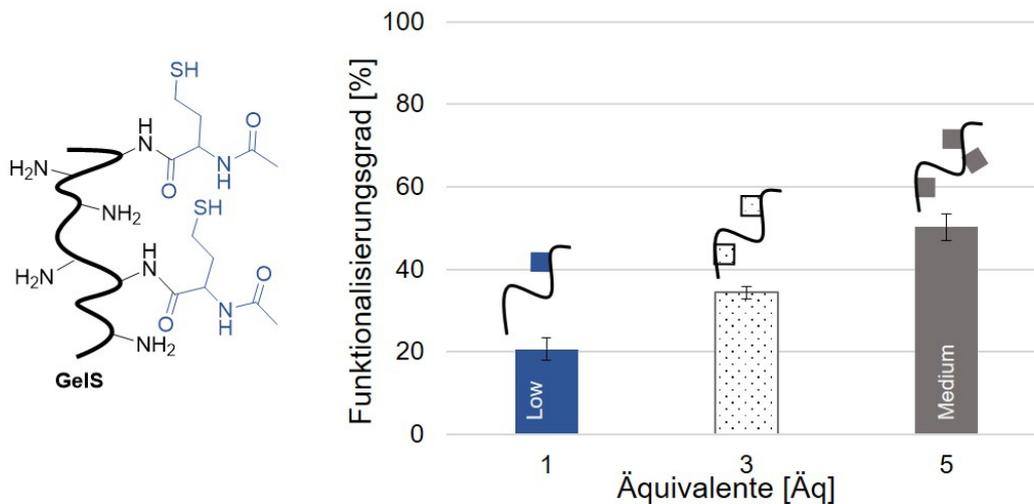


Abbildung 17: Funktionalisierungsgrade von GelS. Die Bestimmung erfolgte mit dem TNBSA-Assay. Beim Einsatz von 1 Äq. N-Acetylhomocysteinthiolacton wurde ein Funktionalisierungsgrad von 20 % erhalten, beim Einsatz von 5 Äq. wurden 50 % der Aminogruppen funktionalisiert. Der Einsatz von 3 Äq. führte zu einem Funktionalisierungsgrad von unter 40 % erhalten. Es wurden nur die Ansätze für GelS Low und GelS Medium als erfolgreich angesehen. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten.

Für die weitere Verwendung von GelS wurde GelS Low mit einem Funktionalisierungsgrad von 20 % und GelS Medium mit einem Funktionalisierungsgrad von 50 % gewählt.¹⁵⁴ Von GelS wurden ¹H-NMR Spektren angefertigt, um den Syntheserfolg zu bestätigen. Die Messung erfolgte bei 40 °C, 400 Hz in D₂O. In Abbildung 18 sind die aufgenommenen Spektren gezeigt. Signale, welche einzelnen Aminosäuren zuzuordnen sind, sind von 1-12 nummeriert. Mit Zunahme des Funktionalisierungsgrades war eine Abnahme der Intensität des Signals bei 3,2 ppm (gelb hinterlegt, NH₂-Gruppe) zu beobachten, so wie eine Zunahme der Signalintensität der Signale bei 2,3 ppm und 2,8 ppm (blau hinterlegt, Cystein).

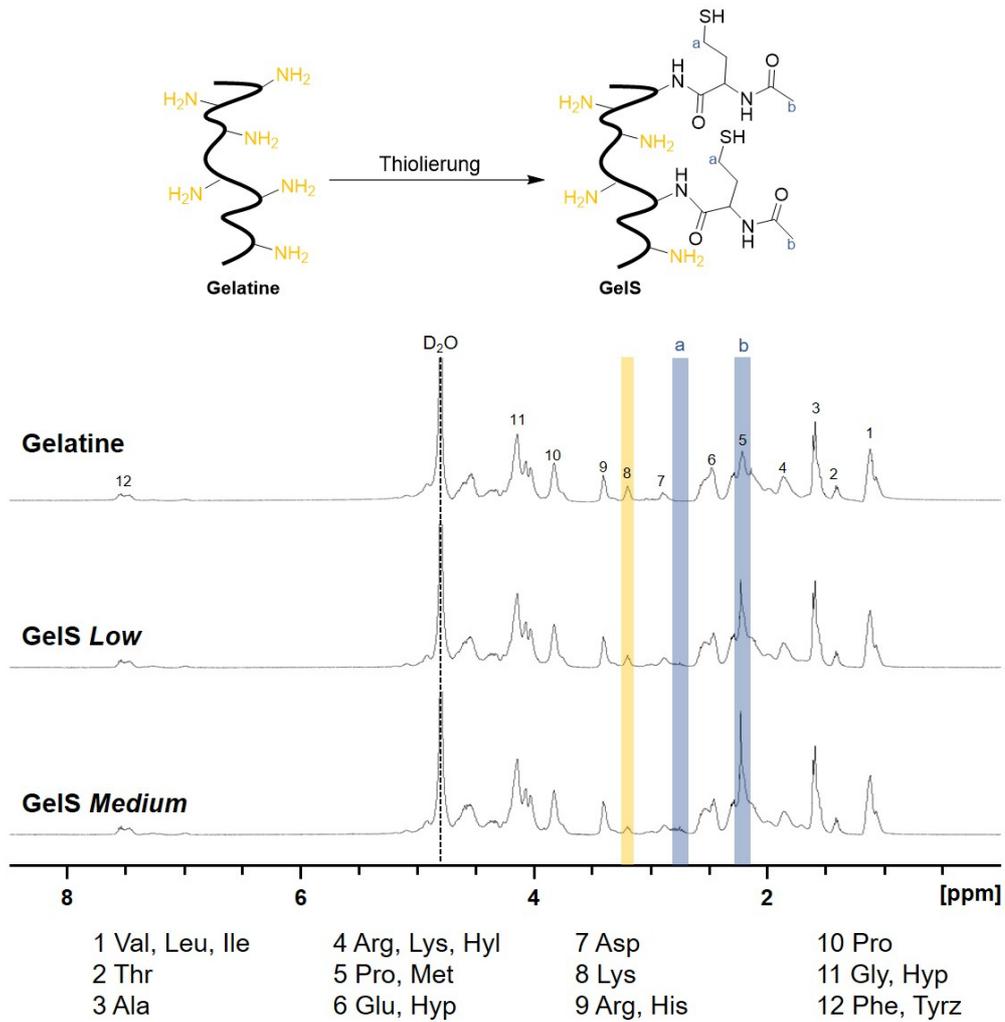


Abbildung 18: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Gelatine und GeIS. Die Messung erfolgte in D_2O bei 400 Hz und 40°C . Das Signal der NH_2 -Gruppe ist gelb hinterlegt, die der Cysteingruppe in blau. Signale, die einzelnen Aminosäuren zuzuordnen sind, sind von 1-12 nummeriert.

3.2 Polymerisation der Photopolymere zum Hydrogel

Durch die Modifikation von Gelatine mit photoreaktiven Gruppen kann diese durch Zugabe eines Photoinitiators und der Bestrahlung mit Licht zu einem stabilen Hydrogel kovalent vernetzt werden. Für die Anwendung im *Tissue Engineering* müssen Photoinitiatoren wasserlöslich sein, dürfen keinen toxischen Effekt auf Zellen haben und müssen Strahlung in einem Wellenlängenbereich absorbieren, der nicht toxisch auf Zellen wirkt.^{118,168} In der Vergangenheit haben sich hierfür besonders Irgacure 2959 und Lithium-Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat (LAP) als geeignet erwiesen.^{168,169} Es zeigte sich jedoch, dass LAP gegenüber Irgacure 2959 eine verminderte Zytotoxizität aufweist und LAP eine erhöhte Wasserlöslichkeit im Vergleich zu Irgacure 2959 aufweist. Durch den Einsatz von LAP lassen sich Hydrogele außerdem mit sichtbarem Licht polymerisieren, da die Absorptionsmaxima von LAP bei 275 nm und 375 nm liegen.¹³⁰ Es konnte gezeigt werden, dass die Viabilität von humanen Leberkrebszellen (HepG2) nach der Behandlung mit LAP in Konzentrationen kleiner als 0,1 % für 72 Stunden nicht unter 50 % fiel. Auch humane Nabelschnurendothelzellen (engl.: *human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) zeigte eine hohe Viabilität nach der Behandlung mit LAP.¹³⁰ Neben dem Photoinitiator kann auch die Strahlungsquelle, die zur Polymerisation verwendet wird, Einfluss auf die Zellen nehmen. Um negative Effekte auf die Viabilität der in den Experimenten verwendeten Zellen (HUVEC und NHDF) auszuschließen, wurde zunächst untersucht, ob sich die Bestrahlung der Zellen mit der Strahlungsquelle Omnicure S2000 negativ auf deren Viabilität auswirkt.

3.2.1 Phototoxizität des Aushärtungssystems Omnicure S2000

3.2.1.1 HUVEC

Vor der Bestimmung der Aushärtungsbedingungen wurde umfassend evaluiert, ob sich die Bestrahlung von HUVEC mit unterschiedlichen Intensitäten (500 mW/cm², 1500 mW/cm², 5000 mW/cm²) mit Licht der Wellenlänge 320-500 nm für 5 s bis 60 s negativ auf die Viabilität der Zellen auswirkt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.

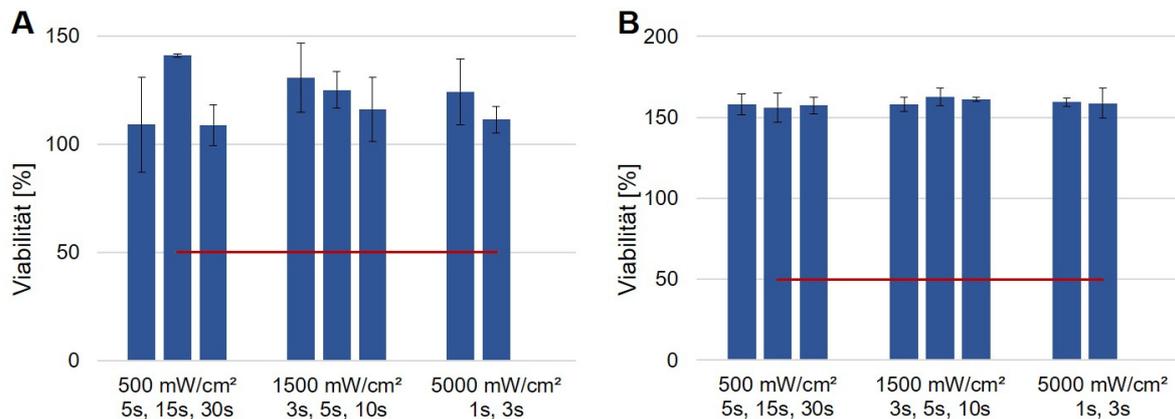


Abbildung 19: Phototoxizität des Aushärtungssystems Omnicure S2000. HUVEC wurden mit unterschiedlichen Intensitäten für verschiedene Zeiträume bestrahlt und die Viabilität der bestrahlten Zellen mit dem MTT-Assay bestimmt. (A) Viabilität direkt nach der Bestrahlung. (B) Viabilität 24 Stunden nach der Bestrahlung. Die Bestimmung erfolgte als test-over-control gegenüber der unbestrahlten Kontrolle. Mittelwerte wurden mit $n=3$ und die Standardabweichung mit $n-1$ ermittelt.¹³⁰

In einer 96-Well Platte wurden 1×10^4 HUVEC/Well ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Vor der Bestrahlung erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zugabe von MTT zur Detektion der Viabilität erfolgte direkt nach der Bestrahlung als auch nach 24 Stunden um eventuelle, erst mit der Zeit auftretende Schäden an den Zellen, zu erfassen. Für alle untersuchten Bedingungen lagen die Viabilität im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle deutlich über 100 %. Es konnte zudem kein Unterschied zwischen den einzelnen Bestrahlungsdauern und Intensitäten festgestellt werden (Abbildung 19A). Nach 24 Stunden lag die Viabilität bei 160 %, unabhängig von den untersuchten Bedingungen (Abbildung 19B). Es konnte kein negativer Effekt durch die Bestrahlung auf HUVEC festgestellt werden, der LD₅₀-Wert lag über den untersuchten Strahlungsintensitäten. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich Strahlung negativ auf Zellen auswirken kann.¹⁷⁰⁻¹⁷² Da sich mit dem MTT-Assay jedoch nur Aussagen über die Viabilität von Zellen treffen lassen, nicht aber über Schäden an DNA oder Zellorganellen, wurde die Strahlungsintensität für die Polymerisation der Hydrogele möglichst klein gewählt und auf 500 mW/cm² festgelegt um eventuelle Strahlungsschäden zu minimieren.

3.2.1.2 NHDF

Nach Festlegung der Bestrahlungsintensität auf 500 mW/cm² für die Polymerisation wurde die Phototoxizität auch an humanen Hautfibroblasten (engl.: *normal human dermal fibroblasts*, NHDF), welche als Modellorganismus dienen sollten, untersucht. Hierzu wurden

1×10^4 NHDF/Well in einer 96-Well Platte ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Vor der Bestrahlung erfolgte ein Mediumwechsel. Zur Detektion der Viabilität erfolgte die Zugabe von MTT direkt nach der Bestrahlung (Abbildung 20A) und 24 Stunden nach der Bestrahlung (Abbildung 20B).

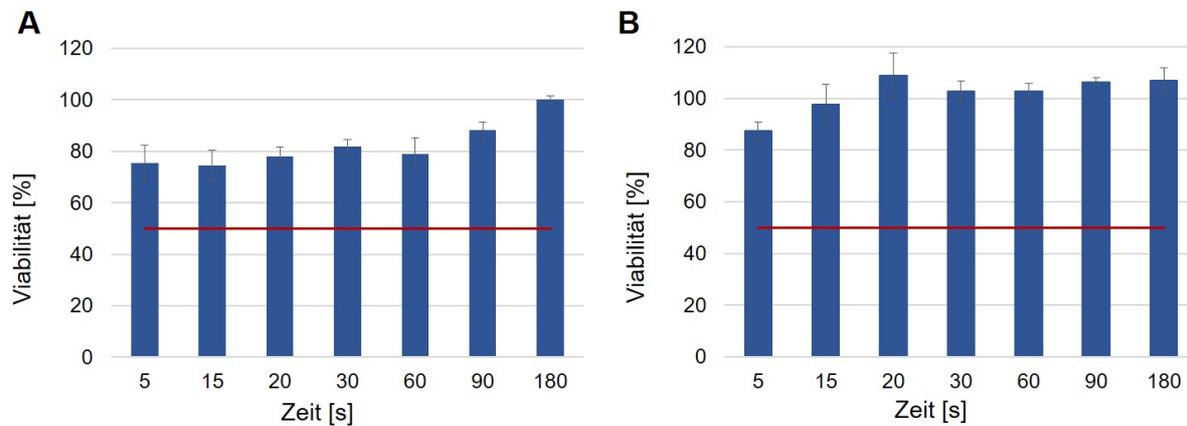


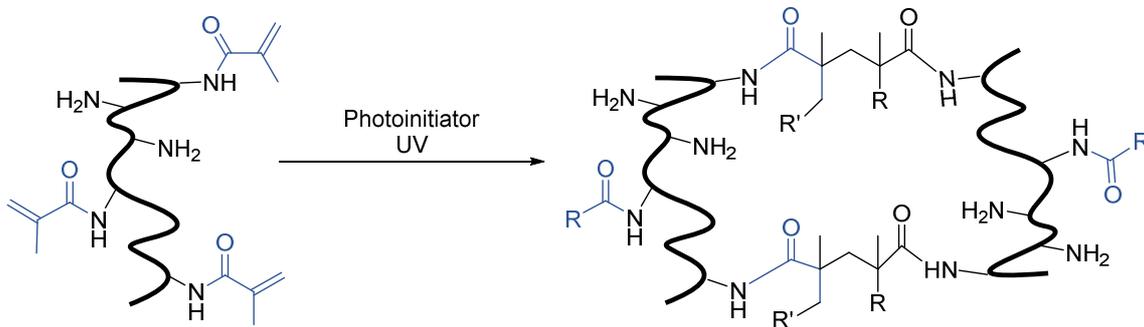
Abbildung 20: Phototoxizität des Aushärtungssystems Omnicure S2000. NHDF wurden mit dem Omnicure S2000 mit 500 mW/cm^2 für unterschiedliche Zeiten bestrahlt und anschließend die Viabilität mit einem MTT-Assay bestimmt. Die Bestimmung erfolgte direkt nach der Bestrahlung und nach 24 Stunden. (A) Viabilität direkt nach der Bestrahlung. (B) Viabilität nach 24 Stunden. Die Bestimmung erfolgte als test-over-control gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Mittelwerte wurden mit $n=3$ und die Standardabweichung mit $n-1$ ermittelt.

Direkt nach der Bestrahlung lagen die Viabilitäten gegenüber der Kontrolle unter 100 %, unabhängig von der Dauer der Bestrahlung. Nach 24 Stunden lagen die Viabilitäten für Bestrahlungsdauern länger als 20 s über 100 % im Vergleich zur Kontrolle. Die letale Dosis 50 (LD_{50}) für eine Bestrahlung mit 500 mW/cm^2 wurde im untersuchten Zeitraum nicht erreicht, dies bestätigte die erwartete Zellverträglichkeit des Aushärtungssystems Omnicure S2000 aus Kapitel 3.2.1.1. Für die Polymerisation von GelMA und GelNB/GelS wurde im weiteren Verlauf mit einer Strahlungsintensität von 500 mW/cm^2 gearbeitet.

3.2.2 Polymerisation von GelMA und GelNB/GelS

Die Bedingungen für die Polymerisation von GelMA und GelNB/GelS zum Hydrogel wurden für Photopolymerlösungen mit einer Konzentration von 5 % bestimmt, da sich in der Vergangenheit gezeigt hat, dass die Konzentration von 5 % für viele Anwendungen im *Tissue Engineering* geeignet ist.^{173,174} Alle weiteren Experimente wurden ebenfalls mit Photopolymerlösungen in einer Konzentration von 5 % durchgeführt. Zur Herstellung der Hydrogele wurde eine Stammlösung des jeweiligen Photopolymers angesetzt, welche mit LAP und DPBS^{-/-} auf 5 % verdünnt wurde, die genaue Zusammensetzung ist Kapitel 6.17 zu entnehmen. Bei einer Strahlungsintensität von 500 mW/cm^2 wurde die zur Polymerisation benötigte Menge Photoinitiator bestimmt. Hierzu wurden die Photopolymere mit 0,3 %, 0,1 %, 0,03 % und 0,01 % LAP versetzt und die jeweilige Probe bis zur optisch erkennbaren Aushärtung bestrahlt (Omniscure S2000, 320-500 nm, 500 mW/cm^2). Alle 5 s wurde die Aushärtung überprüft, nach beginnender Polymerisation wurde die Zeit auf 1 s verkürzt. Die

Polymerisation von GelMA durch Vernetzung der Vinylgruppen der Methacrylatreste verläuft nach einem radikalischen Kettenmechanismus. In Schema 6 ist die Polymerisation von GelMA gezeigt.



Schema 6: Bildung des vernetzten Hydrogels GelMA. Durch Zugabe eines Photoinitiators und die anschließende Bestrahlung kann die radikalische Kettenpolymerisationsreaktion initiiert werden. Durch Bildung von kovalenten Bindungen zwischen den Vinylgruppen entsteht ein stabiles Hydrogel.

Da nicht nur Vinylgruppen unterschiedlicher Gelatineketten miteinander reagieren können, sondern auch Gruppen einer Kette, kann es zur Bildung eines inhomogenen Netzwerkes kommen. Diese Inhomogenität kann sich negativ auf die Stabilität auswirken, da einzelne Ketten nicht miteinander verknüpft werden können.¹⁶² Ein weiterer Nachteil von GelMA liegt im Polymerisationsmechanismus. Bei der radikalischen Kettenpolymerisation werden große Mengen freier Radikale freigesetzt, was Zellen potenziell schädigen kann.¹⁶¹

Zur Festlegung der Polymerisationsbedingungen für GelMA wurde die Photopolymerlösung mit unterschiedlichen Mengen LAP angesetzt und anschließend bestrahlt. Die erhaltenen Polymerisationszeiten für GelMA1.0, GelMA8.0 und GelMA High sind in Abbildung 21 dargestellt.

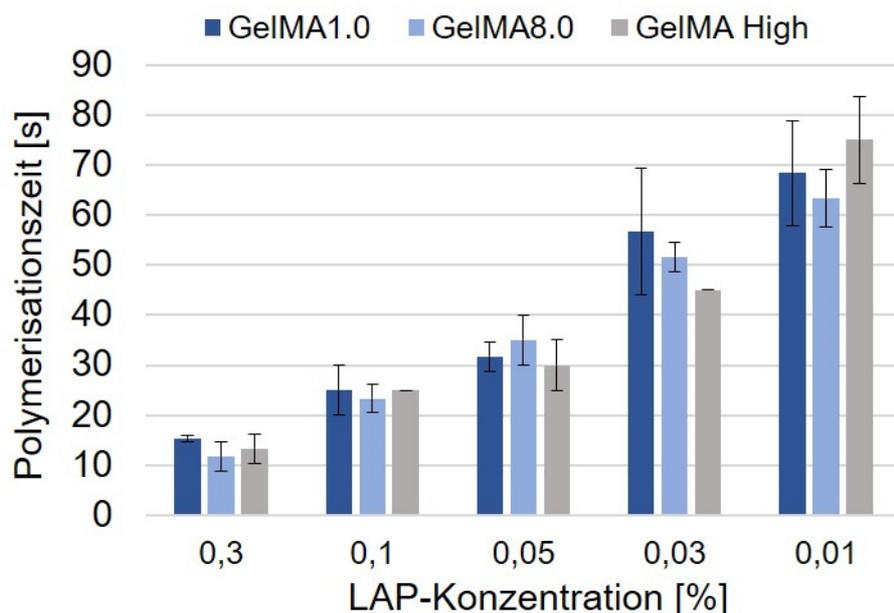
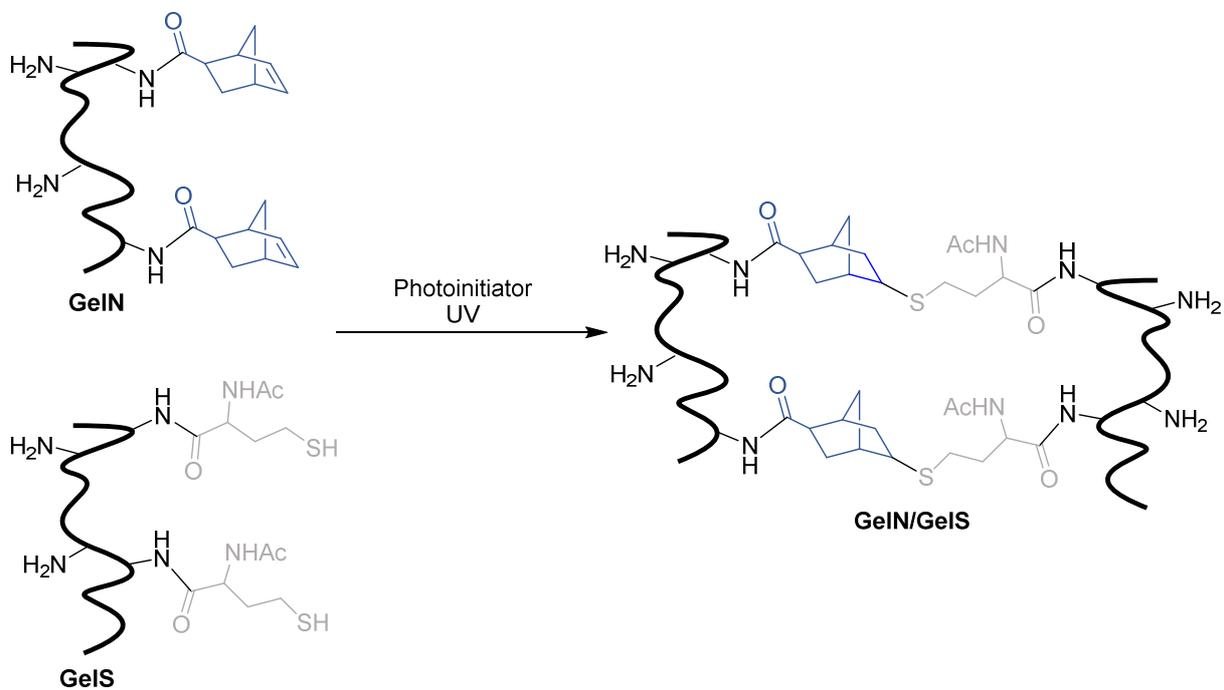


Abbildung 21: Polymerisationszeiten von GelMA in Abhängigkeit der eingesetzten Menge LAP. Die Polymerisation erfolgte mit dem Omnicure S2000 (320-500 nm, 500 mW/cm²). Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten.

Es war kein Zusammenhang zwischen dem Funktionalisierungsgrad von GelMA1.0, GelMA8.0 und GelMA *High* und der Polymerisationszeit erkennbar. Die Polymerisationszeit stieg jedoch mit Abnahme der LAP-Konzentration von 0,3 % auf 0,01 % von 15 s auf über 60 s an. Der Anstieg der Polymerisationszeit wird durch eine Abnahme der freien Radikale mit Reduzierung des Photoinitiators verursacht. Dennoch konnten alle Photopolymerlösungen zum Hydrogel vernetzt werden. Um die Bestrahlungszeit und die Verarbeitungszeit im Hinblick auf den 3D Biodruck kurz zu halten, wurde die zu verwendende Menge LAP auf 0,3 % für GelMA Hydrogele festgelegt. Durch kurze Verarbeitungszeiten kann gewährleistet werden, dass die enthaltenen Zellen nur für wenige Sekunden freien Radikalen ausgesetzt sind.

Die Vernetzung von GelNB mit GeIS (Schema 7) erfolgt durch eine Thiol-En Reaktion, die nach einem radikalischen Stufenmechanismus verläuft.



Schema 7: Polymerisation von GelNB mit GeIS zum Hydrogel GelNB/GeIS. Durch Zugabe eines Photoinitiators und anschließende Bestrahlung können die Photopolymere GelNB und GeIS zum Hydrogel vernetzt werden.

Die radikalische Stufenpolymerisation benötigt weniger freie Radikale und es findet keine Homopolymerisation zwischen den Norbornengruppen statt.¹⁷⁵ Besonders die geringere Menge freier Radikale erhöht die Biokompatibilität gegenüber der radikalischen Kettenpolymerisation von GelMA.¹⁷⁵ Charakteristisch für die eingesetzte Thiol-En Reaktion sind außerdem eine hohe Ausbeute und milde Reaktionsbedingungen.^{46,176} Für den Einsatz im *Tissue Engineering* ist neben diesen Charakteristika auch entscheidend, dass die Reaktion unempfindlich gegenüber dem Einfluss von Wasser und Sauerstoff ist.⁸⁵ Zur optimalen Vernetzung von GelNB mit GeIS zum Hydrogel GelNB/GeIS in den Varianten *Low*, *Medium* und *High* wurden die jeweiligen Photopolymere so kombiniert, dass äquimolare Mengen von Norbornen- und Thiolgruppen vorhanden waren. GelNB *Low* und GeIS *Low* wurden in gleicher

Menge gemischt, da sie den gleichen Funktionalisierungsgrad aufwiesen. Für GelNB/GelS *Medium* wurden GelNB *Medium* und GelS *Medium* ebenfalls in einem Verhältnis von 50:50 gemischt. Um das Hydrogel GelNB/GelS *High* zu erhalten wurde GelS *Medium* im Überschuss zu GelNB *High* gegeben. Da sich die Funktionalisierungsgrade stark unterschieden (GelS *Medium* 55 %, GelNB *High* 97 %) konnte mit einem Mischungsverhältnis von GelNB:GelS 35:65 erreicht werden, dass äquimolare Mengen Norbornen- und Thiolgruppen vorlagen. Die genaue Zusammensetzung ist in Kapitel 6.9.1.2 gezeigt.

Die Bestimmung der Polymerisationsbedingungen für GelNB/GelS wurde analog zu GelMA durchgeführt. GelNB/GelS Lösungen wurden mit unterschiedlichen Mengen LAP versetzt und bis zur optischen Aushärtung bestrahlt (Omniculture S2000, 320-500 nm, 500 mW/cm²). Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt.

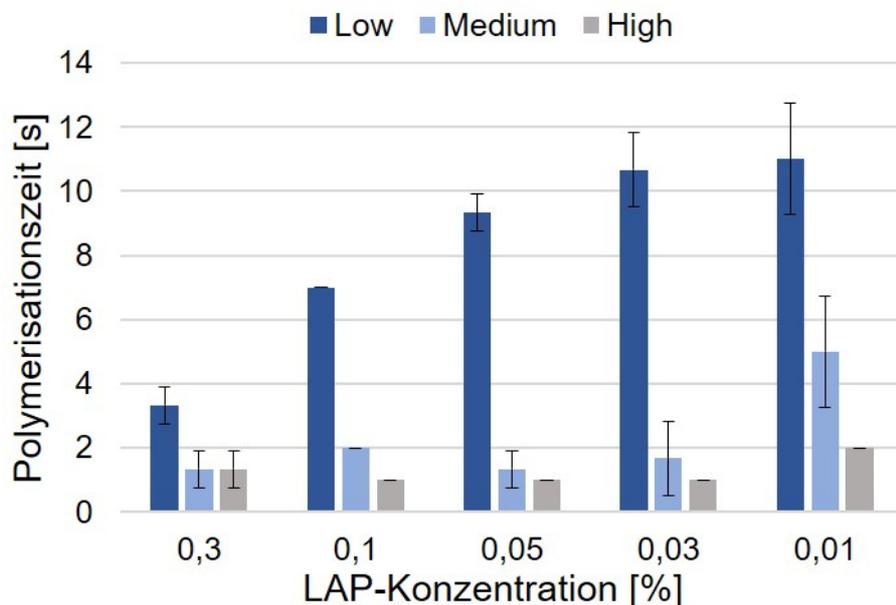


Abbildung 22: Polymerisationszeiten von GelNB/GelS in Abhängigkeit der eingesetzten Menge LAP. Die Polymerisation erfolgte mit dem Omniculture S2000 (320-500 nm, 500 mW/cm²). Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten.

Für GelNB/GelS *Low* konnte eine Polymerisationszeit von 3 s für 0,3 % LAP festgestellt werden. Diese erhöhte sich auf 11 s für eine LAP-Konzentration von 0,01 %. Für die Hydrogele GelNB/GelS *Medium* und *High* zeigte sich dieser Effekt nicht. Die Polymerisationszeiten lagen hier unter 2 s. Nur für GelNB/GelS konnte eine Erhöhung der Polymerisationszeit auf 5 s bei einer LAP-Konzentration von 0,01 % festgestellt werden. Der Unterschied in den Polymerisationszeiten zwischen GelNB/GelS *Low* und *Medium/High* ist damit zu erklären, dass GelNB/GelS durch den niedrigen Funktionalisierungsgrad von nur 20 % auch im polymerisierbaren Zustand sehr weich ist und damit die optisch erkennbare Polymerisation erst verzögert wahrgenommen wurde. Gegenüber GelMA wiesen alle GelNB/GelS Hydrogele deutlich kürzere Polymerisationszeiten bei geringeren Mengen von eingesetztem LAP auf. Für die Polymerisation von GelNB/GelS wurde die zu verwendende Menge LAP auf 0,03 %

festgelegt, um eine Messgenauigkeit bei kleinen Ansatzgrößen zu gewährleisten. Die sehr kurzen Polymerisationszeiten von GelNB/GelS bilden einen weiteren Vorteil gegenüber GelMA, da so die Expositionszeit der Zellen gegenüber den toxischen Einflüssen der Bestrahlung und der freien Radikale deutlich reduziert wird.

3.3 Sterilisation der Hydrogele

Für den Einsatz von Hydrogelen als Material zur Generierung von artifiziellem Gewebe ist es von großer Bedeutung, dass diese möglichst steril verarbeitet werden können.¹⁷⁷ Besonders der Transfer der Anwendung von der Grundlagenforschung in die klinische Phase setzt dies voraus.¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ Für die Sterilisation von festen und flüssigen Materialien kommen unterschiedliche Methoden in Betracht, jedoch sind nicht alle optimal für die Sterilisation von Hydrogelen geeignet.¹⁸⁰ Durch Bestrahlung mit energiereicher Strahlung, zum Beispiel γ -Strahlung, wurden lange Zeit Kunststoffsubstrate für die Anwendung in der Zellkultur sterilisiert.¹⁸¹ Vorteil dieser Methode ist es, dass die Materialien keiner thermischen Belastung ausgesetzt sind und die Strahlung bis tief in das Material vordringen. Durch das Bestrahlen können sich jedoch Farbe und Stabilität des Bestrahlungsgutes ändern und so unbrauchbar machen. Ebenso zeigt sich, dass diese Methode nicht für Materialien geeignet ist, die ihre molekulare Struktur durch diese verändern, wie es bei Photopolymeren der Fall ist.¹⁸² Neben der Bestrahlung, können Feststoffe auch mit Ethylenoxid zur Sterilisation begast werden. Der Vorteil dieser Methode liegt ebenfalls darin, dass der Vorgang bei moderaten Temperaturen ausgeführt wird. Nachteilig zeigt sich bei dieser Methode jedoch, dass sie nur für Feststoffe geeignet ist und eine Exposition von Menschen gegenüber Ethylenoxid unbedingt vermieden werden muss.¹⁸³ Eine weitere Methode zur Sterilisation, ausschließlich für Flüssigkeiten mit niedriger Viskosität, ist das Filtrieren durch einen Filter mit einer Porengröße von maximal $0,2\ \mu\text{m}$.¹⁸⁴ Die Methode ist für gelatine-basierte Photopolymere ungeeignet, da die Lösung während des Filtrierens nicht abkühlen darf um ein Blockieren des Filters zu verhindern. Das Erhitzen von Feststoffen auf $180\ \text{°C}$ für mindestens 2 Stunden ist eine effektive Methode um auch sporenbildende Keime abzutöten.¹⁸⁴ Bei der Arbeit mit Biomaterialien wie Proteinen ist die hohe thermische Belastung jedoch nicht vertretbar.¹⁸⁵ Als Alternative zum Erhitzen können Autoklavieren bei 2 bar und $120\ \text{°C}$ für 20 Minuten (min) oder Tyndallisieren Betracht gezogen werden. Beim Tyndallisieren wird eine Flüssigkeit wiederholt auf $100\ \text{°C}$ erhitzt und bei $37\ \text{°C}$ inkubiert um zurückbleibende Sporen auskeimen zu lassen. Die Methode ist jedoch sehr langwierig und nicht ausreichend zuverlässig.¹⁸⁶ Beim Autoklavieren wird die zu sterilisierende Flüssigkeit zum Kochen gebracht und unter 2 bar Druck für 20 min sterilisiert. Durch die kurze Dauer, kann die thermische Belastung eingeschränkt werden, bei zuverlässiger Abtötung von Keimen.¹⁸⁷ In Abbildung 23 ist eine Übersicht über die Vor- und Nachteile der vorgestellten Sterilisationsmethoden gezeigt.

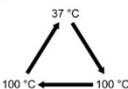
| | |
|--|--|
| <p>Autoklavieren</p>  | <p>Erhitzen unter Druck (2 bar) auf 120 °C für mindestens 20 Minuten</p> <ul style="list-style-type: none"> + Für Flüssigkeiten und Feststoffe + moderate thermische Belastung - Lange Zykluszeit |
| <p>Begasen</p>  | <p>Begasen mit Ethylenoxid</p> <ul style="list-style-type: none"> + niedrige Temperatur - Nur für Feststoffe - Toxisch für Menschen |
| <p>Bestrahlen</p>  | <p>Bestrahlen mit energiereicher Strahlung</p> <ul style="list-style-type: none"> + keine thermische Belastung + hohe Eindringtiefe - Veränderung (z.B. der Farbe) am Bestahlungsgut |
| <p>Erhitzen</p>  | <p>Erhitzen auf 180 °C für mindestens 2 Stunden</p> <ul style="list-style-type: none"> + Erreicht auch schlecht zugängliche Strukturen - Große thermische Belastung - Nur für hitzeunempfindliches Material |
| <p>Filtrieren</p>  | <p>Filtrieren durch Poren mit einem maximalen Durchmesser von 0,2 µm</p> <ul style="list-style-type: none"> + einfach - Nur für niedrig-viskoses Material |
| <p>Tyndallisieren</p>  | <p>Erhitzen auf 100 °C für mindestens 20 Minuten, dann inkubieren bei 37 °C, erneutes Erhitzen (3 Tage hintereinander)</p> <ul style="list-style-type: none"> + moderate thermische Belastung - Lange Dauer |

Abbildung 23: Übersicht über unterschiedliche Sterilisationsmethoden und ihre Vor- und Nachteile.

Da sich das Autoklavieren als einfache und günstige Methode für Flüssigkeiten für den Einsatz in der Zellkultur erwiesen hat, wurde untersucht, ob sich auch die Hydrogele GelMA und GelNB/GelS durch Autoklavieren sterilisieren lassen, ohne dass gravierende Veränderungen ihrer Funktionalisierung und ihrer Stabilität auftreten. Proben aus nicht autoklavierten Stammlösungen werden im Folgenden mit einem Minus (-) gekennzeichnet, Proben aus autoklavierten Stammlösungen mit einem Plus (+).

3.3.1 Probenvorbereitung und Sterilisationsprozess

Um zu gewährleisten, dass der Vergleich der Proben vor und nach dem Autoklavieren von einer Lösung möglich ist, wurden die Photopolymere GelMA, GelNB und GelS speziell für diese Analyse neu synthetisiert. Da das Autoklavieren von Flüssigkeiten nicht in dicht verschlossenen Gefäßen durchgeführt werden konnte, wurde zunächst untersucht, wie groß der Volumenverlust während des Autoklavierens war. Hierzu wurden Stammlösungen der Photopolymere in Probengläschen angesetzt (GelMA 10% w/v, GelNB 10 % w/v, GelS 5 % w/v). Das Gesamtgewicht der gefüllten Gläschen wurde vor dem Autoklavieren bestimmt und die Gläschen mit angedrehtem Deckel in einem mit Alufolie verschlossenen Becherglas aufrecht stehend autoklaviert (121 °C, 20 min). Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Gesamtmasse erneut bestimmt und die Massendifferenz durch Zugabe des Lösungsmittels unter sterilen Bedingungen ausgeglichen. Die zu ersetzenden Volumina

unterschieden sich zwischen den einzelnen Proben und mussten jeweils individuell ausgeglichen werden.

3.3.2 Einfluss auf Gelatine

Um zu beurteilen, ob der Autoklaviervorgang die Zusammensetzung der Gelatine hinsichtlich primärer Aminogruppen beeinflusst, wurde die Stoffmenge freier Aminogruppen in Gelatine mit dem TNBSA-Assay bestimmt. Hierzu wurden die zu analysierenden Lösungen in doppelter Menge angesetzt und ein Teil davon autoklaviert. Die Probenvorbereitung erfolgte in Natriumcarbonatpuffer (0,1 M, pH 8,5). Die Durchführung des TNBSA-Assays erfolgte analog zur Analyse der zur Synthese eingesetzten Gelatine (Kapitel 3.1.1) unter Hinzuziehung der in Abbildung 24 gezeigten Standardkurve.

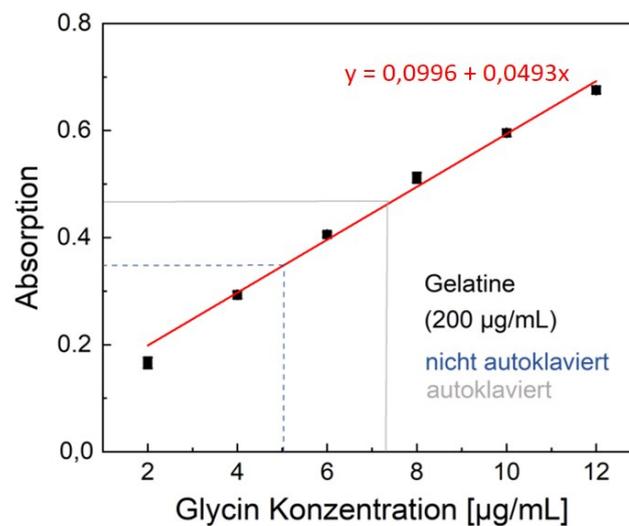


Abbildung 24: Standardkurve zur Bestimmung der freien Aminogruppen in autoklavierter (grau) und nicht autoklavierter (blau) Gelatine. Durch den Autoklaviervorgang erhöhte sich der Gehalt freier Aminogruppen von 0,33 mmol/g auf 0,46 mmol/g.

Aus den erhaltenen Absorptionswerten für Gelatine⁺ und Gelatine⁻ nach der Reaktion mit TNBSA konnte eine Stoffmenge von freien Aminogruppen von 0,33 mmol/g für die nicht autoklavierte Probe ermittelt werden. Für Gelatine⁺ wurde ein Wert von 0,46 mmol(NH₂)/g ermittelt. Der Wert für Gelatine⁻ unterscheidet sich von dem in Kapitel 3.1.1 ermittelten Wert, was sich darauf zurückführen lässt, dass für die Untersuchung des Autoklaviervorganges eine neue Charge Gelatine verwendet wurde. Der Unterschied zwischen der Gelatine⁺ und Gelatine⁻ ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass Peptidbindungen nicht hitzestabil sind.¹⁸⁸ Somit ist es möglich, dass Gelatine in noch kürzere Ketten gespalten wird und sich so zusätzliche N-Termini bilden, die mit TNBSA reagieren können. Ebenso können einzelne Aminosäuren freigesetzt werden, die den Anteil primärer Aminogruppen erhöhen könnten.

3.3.3 Einfluss auf den Funktionalisierungsgrad und die Polymerisation

Für die Synthese der Photopolymere wurde die in Kapitel 3.3.2 analysierte Gelatine eingesetzt, somit wurde gewährleistet, dass der zur Berechnung des Funktionalisierungsgrades genutzte

Absorptionswert der Gelatine der verwendeten Charge entsprach. Vor der Bestimmung des Funktionalisierungsgrades wurde versucht, die jeweiligen Hydrogele unter den Standardbedingungen (Kapitel 6.9) zu polymerisieren. In Abbildung 25A und C sind die Erfolge der Polymerisation der Hydrogele GelMA⁻ aus nicht autoklavierter Stammlösung und GelMA⁺ aus autoklavierter Stammlösung und GelNB/GelS⁻ und GelNB/GelS⁺ gezeigt. Es ließen sich alle Photopolymere zum Hydrogel aushärten, lediglich für die am schwächsten funktionalisierten Varianten GelMA1.0⁺ und GelNB/GelS Low⁺ konnte keine Polymerisierung mehr erreicht werden. Um zu überprüfen, ob dies auf eine Veränderung des Funktionalisierungsgrades zurückzuführen ist, wurden die Photopolymerlösungen analog zu Kapitel 3.1.2 und 3.1.3 und in einem weiteren TNBSA-Assay analysiert. Die Photopolymere wurden in Natriumcarbonatpuffer als Stammlösung gelöst und ein Teil autoklaviert. Die erhaltenen Funktionalisierungsgrade für GelMA sind in Abbildung 25B dargestellt.

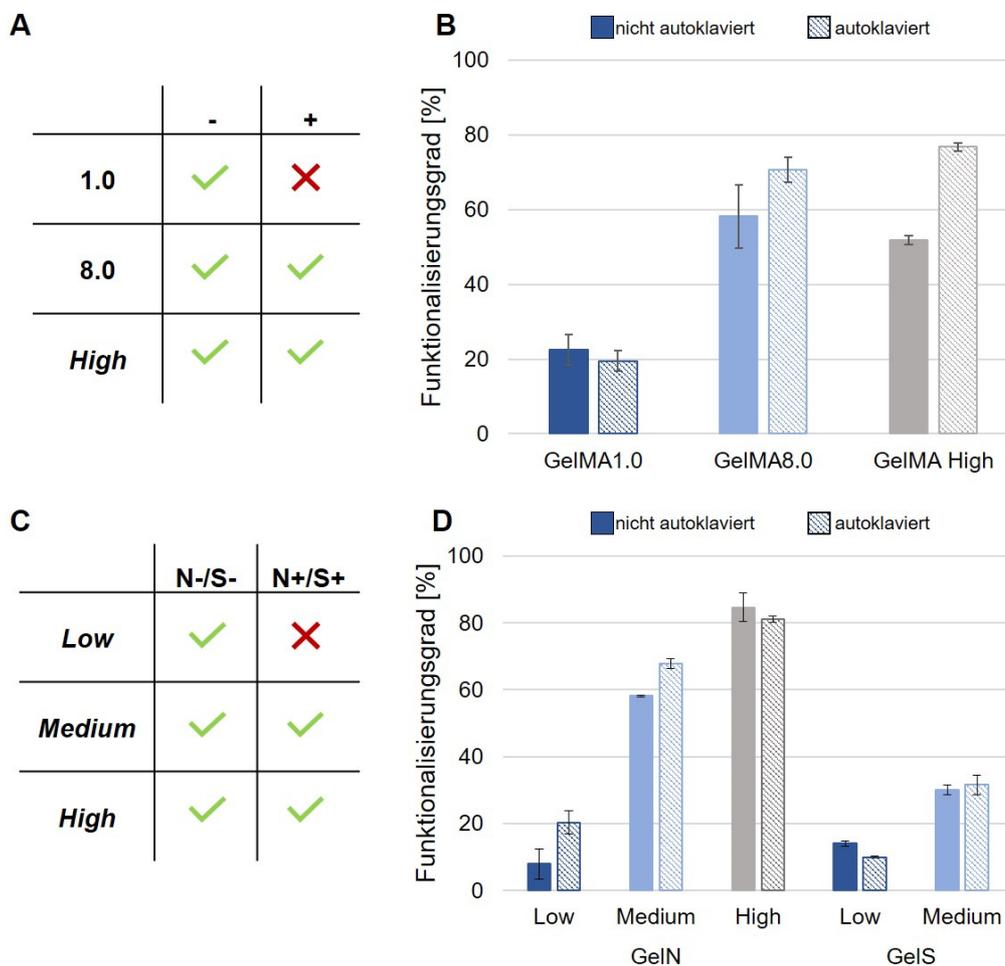


Abbildung 25: Polymerisationserfolg und Funktionalisierungsgrade der Hydrogele GelMA und GelNB/GelS nach dem Autoklavieren. (A) Polymerisation von GelMA⁻. GelMA1.0⁺ ließ sich nach dem Autoklavieren nicht mehr polymerisieren. (B) Funktionalisierungsgrade von GelMA. (C) Polymerisation von GelNB/GelS. GelNB/GelS Low⁺ ließ sich nach dem Autoklavieren nicht mehr polymerisieren. (D) Funktionalisierungsgrade von GelNB und GelS. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten, die Berechnung des Mittelwertes mit $n=3$, die der Standardabweichung mit $n-1$.

Für GelMA1.0⁺ zeigte sich eine geringe Abnahme des Funktionalisierungsgrades auf 20 %, was für die erfolglose Polymerisation verantwortlich sein kann. Entgegen der Erwartung zeigten GelMA8.0⁺ und GelMA *High*⁺ eine Erhöhung des Funktionalisierungsgrades auf 70 % beziehungsweise 76 %. Hierfür wurde keine Erklärung gefunden. In Abbildung 25D sind die erhaltenen Funktionalisierungsgrade für GelNB und GelS gezeigt. GelNB *Low*⁺ und GelNB *Medium*⁺ wiesen eine Erhöhung des Funktionalisierungsgrades um 13 % und 8 % auf, während der Funktionalisierungsgrad von GelNB *High*⁺ abnahm. Für GelS *Low*⁺ zeigte sich eine Abnahme des Funktionalisierungsgrades von 14 % auf 10 %, für GelS *Medium*⁺ eine geringe Zunahme von 30 % auf 32 %. Die deutliche Erniedrigung des Funktionalisierungsgrades von GelS *Low* kann die erfolglose Polymerisation von GelNB/GelS *Low* erklären. Wie schon für GelMA konnte nicht abschließend geklärt werden, warum sich der Funktionalisierungsgrad entgegen der Erwartung erhöhte. Um die Funktionalisierung zusätzlich zum TNBSA-Assay beurteilen zu können, wurden ¹H-NMR Spektren angefertigt. In Abbildung 26 sind die Spektren von Gelatine, GelMA8.0, GelN2 (*Medium*) und GelS5 (*Medium*) dargestellt.

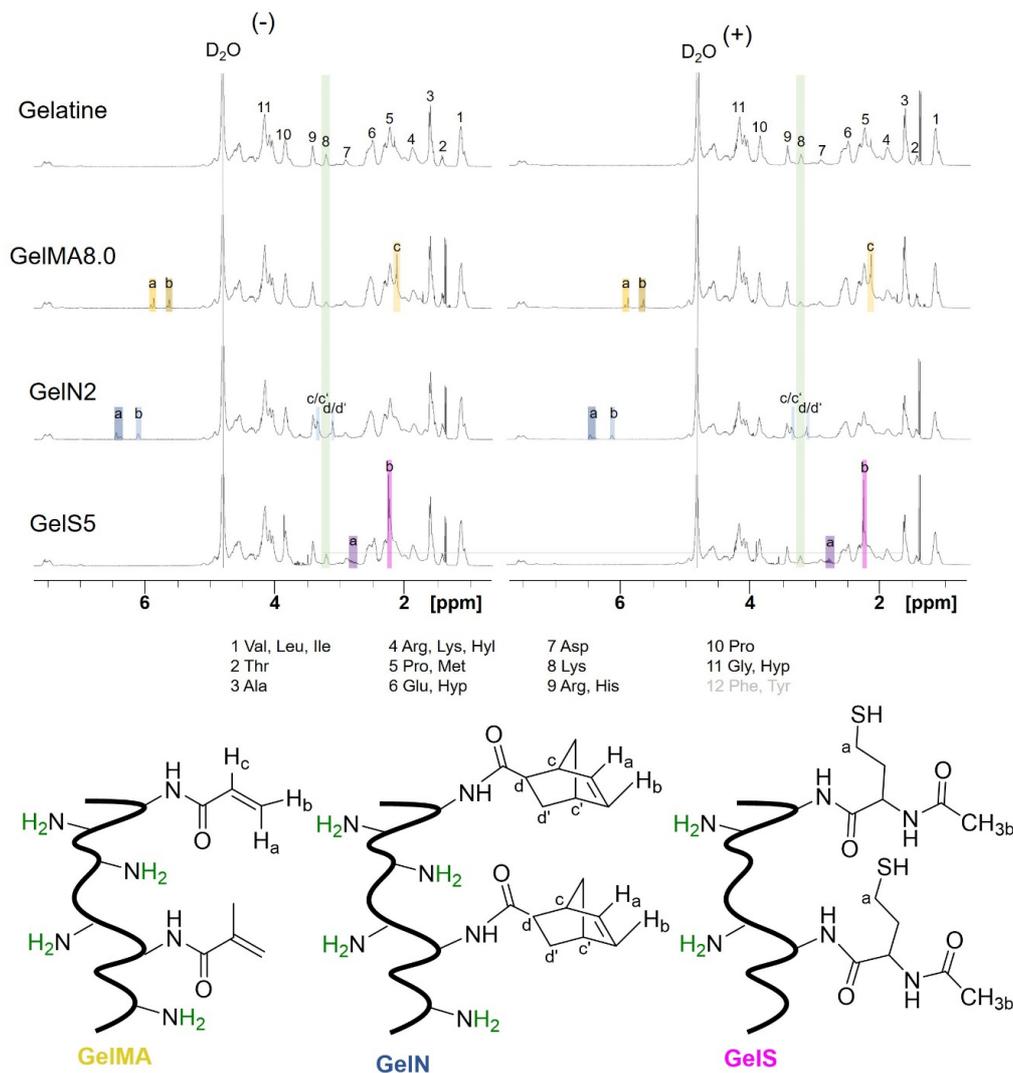


Abbildung 26: ¹H-NMR Spektren von Gelatine, GelMA8.0, GelNB Medium und GelS Medium. Die Messung erfolgte in D₂O bei 40 °C und 400 Hz. Links sind die Spektren der nicht autoklavierten (-) Proben dargestellt, rechts die der autoklavierten (+) Proben.

Im ¹H-NMR Spektrum der Gelatine konnten keine Unterschiede zwischen Gelatine⁻ und Gelatine⁺ festgestellt werden. Ob sich die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Gelatine durch das Autoklavieren kann im NMR nicht erkannt werden. Die eingeführten funktionellen Gruppen in GelMA8.0, GelNB Medium und GelS Medium konnten ebenfalls vor und nach dem Autoklavieren nachgewiesen werden. Somit hat das Autoklavieren nicht zu einem vollständigen Verlust der Funktionalisierung geführt, dies konnten auch O'Connell et al zeigen.¹⁸⁹ Eine quantitative Einschätzung konnte in Ermangelung eines internen Standards nicht getroffen werden. Die Gele wurden deshalb einer rheologischen Charakterisierung unterzogen um eventuelle Unterschiede in der Stabilität beurteilen zu können.

3.3.4 Einfluss auf die viskoelastischen Eigenschaften und die Geliertemperatur

Um beurteilen zu können, wie sich das Autoklavieren der Stammlösungen auf die viskoelastischen Eigenschaften der vernetzten Hydrogele auswirkt, wurden der Speichermodul G' und Verlustmodul G'' von vernetzten Hydrogelen aus nicht autoklavierten (-) und autoklavierten (+) Stammlösungen bestimmt. Die Messungen erfolgten in Kooperation mit Bruna Regina Maciel (Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik, KIT). Die Photopolymere wurden als 10 %-ige Stammlösung angesetzt und ein Teil davon autoklaviert. Anschließend wurde wie oben beschrieben der Volumenverlust ausgeglichen und die Photopolymerlösung mit LAP und DPBS^{-/-} auf 5 % verdünnt. Die Lösungen wurden zur Vernetzung mit dem Omnicure S2000 (320-500 nm, 500 mW/cm²) bestrahlt und in DPBS^{-/-}quellen gelassen. Zur Bestimmung von G' und G'' wurden Oszillationsmessungen mit einer konstanten Amplitude von 3 Pa über einen Frequenzbereich von 0,1-100 rad/s (HAAKE Rheoscope, Thermo Fisher Scientific, PP20 Messplatte, Messspalt 1 mm) bei 37 °C durchgeführt. Die Ergebnisse der Oszillationsmessungen sind in Abbildung 27 gezeigt.

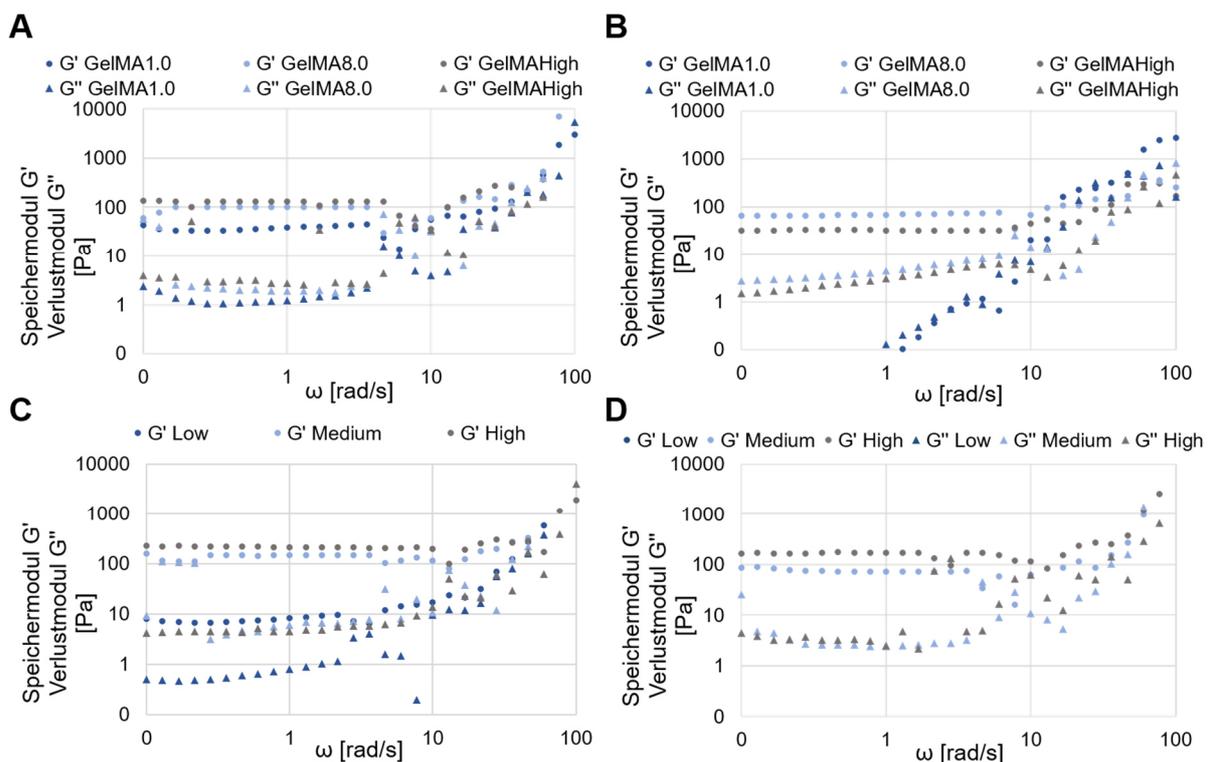


Abbildung 27: Daten der Oszillationsmessung von Speicher- und Verlustmodul der Hydrogele vor und nach dem Autoklavieren. Die Messung erfolgte über einen Frequenzbereich von 0-100 rad/s mit einem Platte-Platte Rheometer. (A) GelMA⁻; (B) GelMA⁺; (C) GelNB/GelS⁻; (D) GelNB/GelS⁺. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten, die Berechnung des Mittelwertes mit $n=3$, die der Standardabweichung mit $n-1$.

Der Speichermodul G' beschreibt die elastischen Eigenschaften von Materialien, er gibt die gespeicherte Deformationsenergie wieder. Der Verlustmodul G'' beschreibt das viskose Verhalten eines Materials.¹²⁵ Liegen die Werte von G' deutlich über denen von G'' , liegt ein Material mit Feststoffverhalten vor. Für die nicht autoklavierten GelMA Proben (Abbildung 27A)

konnte so die Polymerisation bestätigt werden. In Abbildung 17B ist zu erkennen, dass die gemessenen Werte für GelMA8.0 und GelMA *High* einen größeren Speicher- als Verlustmodul aufwiesen, während die Werte für GelMA1.0 keine Differenz aufwiesen. Dies bestätigte die Ergebnisse aus Kapitel 3.3.3, dass sich nur GelMA8.0 und GelMA *High* nach dem Autoklavieren polymerisieren ließen. In Abbildung 27C sind die Daten der Oszillationsmessung von nicht autoklaviertem GelNB/GelS dargestellt. Die Polymerisation konnte für alle Varianten (*Low*, *Medium*, *High*) bestätigt werden, da die Werte für den Speichermodul über denen des Verlustmoduls lagen. Für die Gele aus autoklavierten Stammlösungen (Abbildung 27D) konnte eine erfolgreiche Polymerisation nur für GelNB/GelS *Medium* und *High* gezeigt werden. Nur für diese Gele überstiegen die Werte von G' die des Verlustmoduls. Für GelNB/GelS *Low* konnten keine Werte mehr aufgezeichnet werden. Für GelNB/GelS konnten durch die Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften die Ergebnisse aus Kapitel 3.3.3 ebenfalls bestätigt werden. Für den Vergleich der Speichermodule G' der Gele aus nicht autoklavierten und autoklavierten Stammlösungen wurden die Plateau-Speichermodule ermittelt. In Abbildung 28A sind die Plateau-Speichermodule für GelMA gezeigt.

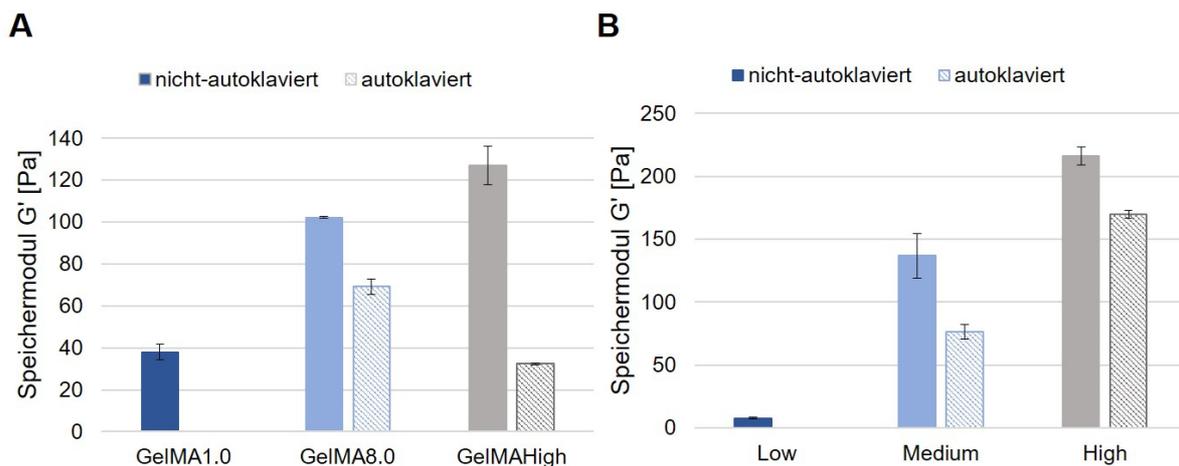


Abbildung 28: Plateau-Speichermodule von GelMA und GelNB/GelS aus autoklavierten und nicht autoklavierten Stammlösungen. (A) GelMA, (B) GelNB/GelS. Gefüllt – nicht autoklaviert, schraffiert – autoklaviert. Die Bestimmung erfolgte in Triplicaten, die Berechnung des Mittelwertes mit $n=3$, die der Standardabweichung mit $n-1$.

Es ist zu erkennen, dass das Speichermodul mit dem Funktionalisierungsgrad zunimmt. Für die Gele aus der autoklavierten Stammlösung zeigt sich eine starke Abnahme des Speichermoduls. Für GelMA1.0 konnte kein Plateau-Speichermodul ermittelt werden. Der Speichermodul von GelMA8.0 lag vor dem Autoklavieren bei 100 Pa, nach dem Autoklavieren konnten 62 Pa ermittelt werden. Für GelMA *High* wurde ein Speichermodul von 122 Pa vor dem Autoklavieren und von 30 Pa nach dem Autoklavieren ermittelt. In Abbildung 28B sind die Plateau-Speichermodule für GelNB/GelS dargestellt. Hier zeigte sich ebenfalls eine Zunahme des Speichermoduls G' vor dem Autoklavieren von *Low* < *Medium* < *High*. Diese Zunahme zeigte sich auch nach dem Autoklavieren, wobei jedoch für GelNB/GelS *Low* kein Plateau-Speichermodul mehr ermittelt werden konnte. Die Plateau-Speichermodule der Gele aus

autoklavierten Stammlösungen lagen auch für GelNB/GelS unter denen der nicht autoklavierten Proben. GelNB/GelS *Medium*⁻ wies ein Speichermodul von 140 Pa auf, GelNB/GelS *Medium*⁺ ein Speichermodul von 70 Pa. Für GelNB/GelS *High*⁻ konnte ein Speichermodul von >200 Pa ermittelt werden, für GelNB/GelS *High*⁺ ein Speichermodul von 160 Pa. Der Abfall der Speichermodule durch den Autoklaviervorgang kann darauf zurückgeführt werden, dass die hohe Temperatur während des Autoklavierens das Peptidrückgrat der Gelatine zerstört. Dies wird im Herstellungsprozess von Gelatine genutzt, um Gelatine mit unterschiedlicher Gelierkraft (Bloom-Zahl) zu erhalten.^{150,190} Die Veränderung der viskoelastischen Eigenschaften deckte sich mit Erfahrungen aus der Literatur, O'Connell *et al.* konnten zeigen, dass der Speichermodul von autoklavierten GelMA-Lösungen stark abnahm.¹⁸⁹ Durch das Autoklavieren werden die Gelatineketten verkürzt und verlieren so, trotz kovalenter Vernetzung, an Stabilität. Bei sehr geringer Funktionalisierung, wie es bei GelMA1.0 und GelNB/GelS *Low* der Fall war, führt dies dazu, dass die Photopolymere nicht mehr stabil polymerisiert werden können. Im Hinblick auf den Einsatz der gelatine-basierten Hydrogele im extrusionsbasierten 3D Biodruck, wurde zusätzlich der Einfluss des Autoklavierens auf die Geliertemperatur der Gelatine und die Photopolymerlösungen GelMA8.0 und GelNB/GelS *Medium* untersucht. Um den Temperaturbereich für die Messung am Rheometer (Physika M501, Anton Paar, konische Messplatte CP35/3, Anton Paar) zu bestimmen, wurden die Lösungen (5 % in DPBS^{-/-}) zunächst auf verschiedene Temperaturen (37 °C, 30 °C, 25 °C, 23 °C, 20 °C, 17 °C, 15 °C) gebracht und beobachtet, wann ein optisch erkennbares Gelieren eintrat. Für Gelatine⁻ wurde die Gelierung bei 25 °C erkannt, für GelMA8.0⁻ und GelNB/GelS *Medium*⁻ bei 23 °C. Die Gelierung der autoklavierten Proben trat bei etwas niedrigeren Temperaturen ein, 20 °C für Gelatine⁺ und GelMA8.0⁺, 17 °C für GelNB/GelS *Medium*⁺. Aus diesen Ergebnissen wurden die Messbereiche von 32 °C bis 14 °C für die nicht autoklavierten Proben, 25 °C bis 7 °C für Gelatine⁺/GelMA8.0⁺ und 15 °C bis 3 °C für GelNB/GelS *Medium*⁺ festgelegt. Die Messung erfolgte mit einer Abkühlrate von 0,6 °C/Min mit einer konstanten Deformation von 0,1 % und einer konstanten Frequenz von 10 rad/s. In Abbildung 29 ((A) Gelatine, (B) GelMA8.0, (C) GelNB/GelS *Medium*) sind die Daten des Temperaturdurchlaufes dargestellt.

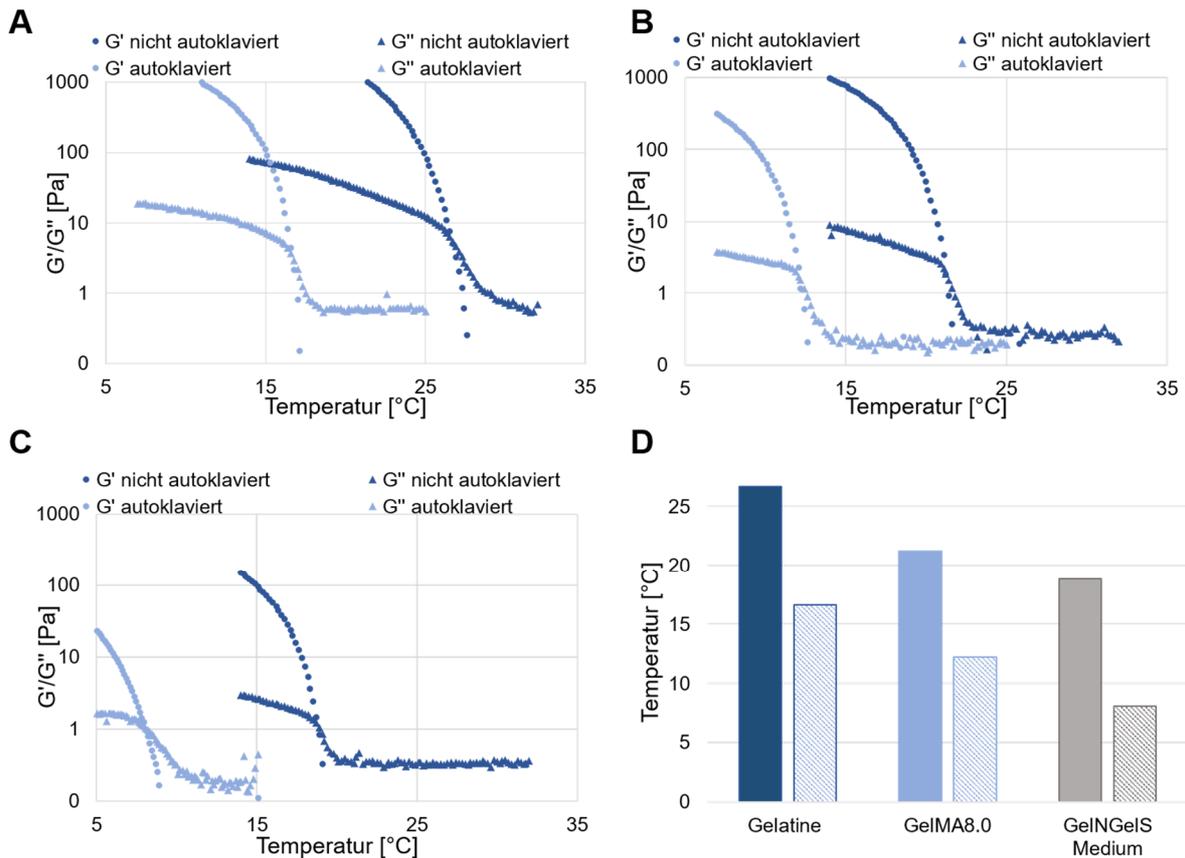


Abbildung 29: Bestimmung der Geliertemperatur von Gelatine, GelMA8.0 und GelNB/GelS Medium vor und nach dem Autoklavieren. (A) Gelatine, (B) GelMA8.0, (C) GelNB/GelS Medium, (D) Geliertemperatur. Es wurden 5 %ige Photopolymerlösungen ohne Photoinitiator untersucht. Gefüllt – nicht autoklaviert, schraffiert – autoklaviert.

Als Geliertemperatur wird die Temperatur bezeichnet, bei der sich das Verhältnis von G' zu G'' umkehrt. Ab dieser Temperatur zeigt die untersuchte Probe ein Festkörperverhalten und der elastischen Anteil repräsentierende Speichermodul G' liegt über dem Verlustmodul G'' . Durch Bestimmung des Schnittpunktes der beiden Kurven konnte die Geliertemperatur bestimmt werden. Abbildung 29D zeigt die bestimmten Geliertemperaturen. Für Gelatine wurden $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ ermittelt, für Gelatine⁺ $17\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Geliertemperatur von GelMA8.0 betrug $21\text{ }^{\circ}\text{C}$, GelMA8.0⁺ wies eine Geliertemperatur von $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf. GelNB/GelS Medium zeigte eine Geliertemperatur von $19\text{ }^{\circ}\text{C}$, GelNB/GelS Medium⁺ von $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Der Abfall der Geliertemperaturen um etwa $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ für alle untersuchten Proben, kann auf die hohe Temperatur beim Autoklavieren zurückgeführt werden. Durch das Erhitzen der Gelatine sinkt deren Geliertemperatur.¹⁵⁰ Die Differenz der Geliertemperatur zwischen der Gelatine und den Photopolymerlösungen ist auf deren Funktionalisierung zurückzuführen. Die Funktionalisierung wirkt sich hindernd auf die Kettenverstrickung aus, verhindert diese jedoch nicht vollständig.¹³⁰

3.3.5 Sterilität

Abschließend wurde untersucht, ob das Autoklavieren der Stammlösungen ausreichend ist, um Sterilität zu erreichen. Hierzu wurden Stammlösungen aus Photopolymeren angesetzt, die gezielt durch Kontakt mit Händen und Fußböden verunreinigt wurden (Abbildung 30/Abbildung 31, verunreinigt). Ebenso wurden Stammlösungen aus Photopolymeren angesetzt, welche ohne besondere Rücksicht auf Kontaminationen angesetzt wurden (Abbildung 30/Abbildung 31, unsteril). Für das Ansetzen der sterilen Stammlösungen (Abbildung 30/Abbildung 31, steril) wurde darauf geachtet, dass während des Wiegens Handschuhe getragen wurden und der Feststoff mit einer desinfizierten Pinzette entnommen wurde. Das Lösen erfolgte hierfür unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank in sterilem DPBS^{-/-}. Zum Autoklavieren wurden die Photopolymere in 5 %igen Stammlösungen angesetzt und jeweils ein Teil davon autoklaviert (Abbildung 30/Abbildung 31, autoklaviert). Das Ausplattieren auf Agarplatten der Photopolymerlösungen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Je 100 µL der jeweiligen Stammlösung wurden auf eine Platte gegeben und mit sterilen Glaskügelchen verteilt. Die Platten wurden bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert und anschließend fotografisch dokumentiert. Um auszuschließen, dass die Kontamination der sterilen Proben durch das Lösungsmittel verursacht wurde, wurde DPBS^{-/-} ebenfalls auf Agarplatten aufgetragen (Abbildung 102). Die mit GelMA8.0 behandelten Platten sind in Abbildung 30 gezeigt.

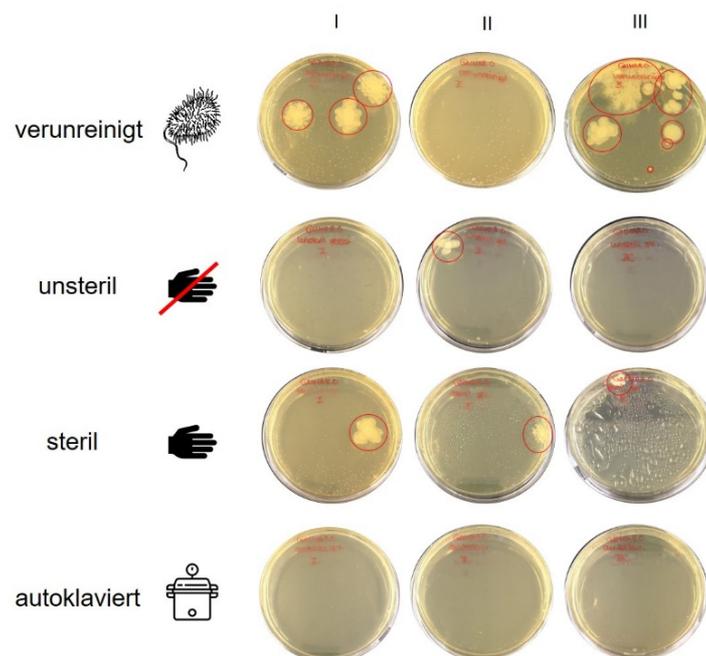


Abbildung 30: Überprüfung der Sterilität verschieden gehandhabter GelMA-Lösungen. Nur die autoklavierten Lösungen führten zuverlässig zu Keimfreiheit.

Das Auftragen der gezielt verunreinigten Lösungen führte zu Kontaminationen, ebenso die Lösungen, welche unsteril eingewogen wurden. Deutlich wurde auch, dass sich auch unter Einhaltung aller Vorkehrungen Kontaminationen zeigen können, wie im Falle der steril angesetzten Lösungen erkennbar war. Einzig die vor dem Auftragen autoklavierten Lösungen

zeigten keine Kontaminationen. Somit konnte gezeigt werden, dass das Autoklavieren im Hinblick auf die Sterilität der Proben eine geeignete Methode darstellt. Die Überprüfung der Sterilität von GelMA1.0 und GelMA *High* ist in Abbildung 103 (Anhang) gezeigt. Analog zur Untersuchung der Sterilität von GelMA8.0 wurden auch die Photopolymerlösungen GelNB und GelS untersucht. Abbildung 31 ((A) GelNB *Medium*, (B) GelS *Medium*) zeigt die Agarplatten nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C.

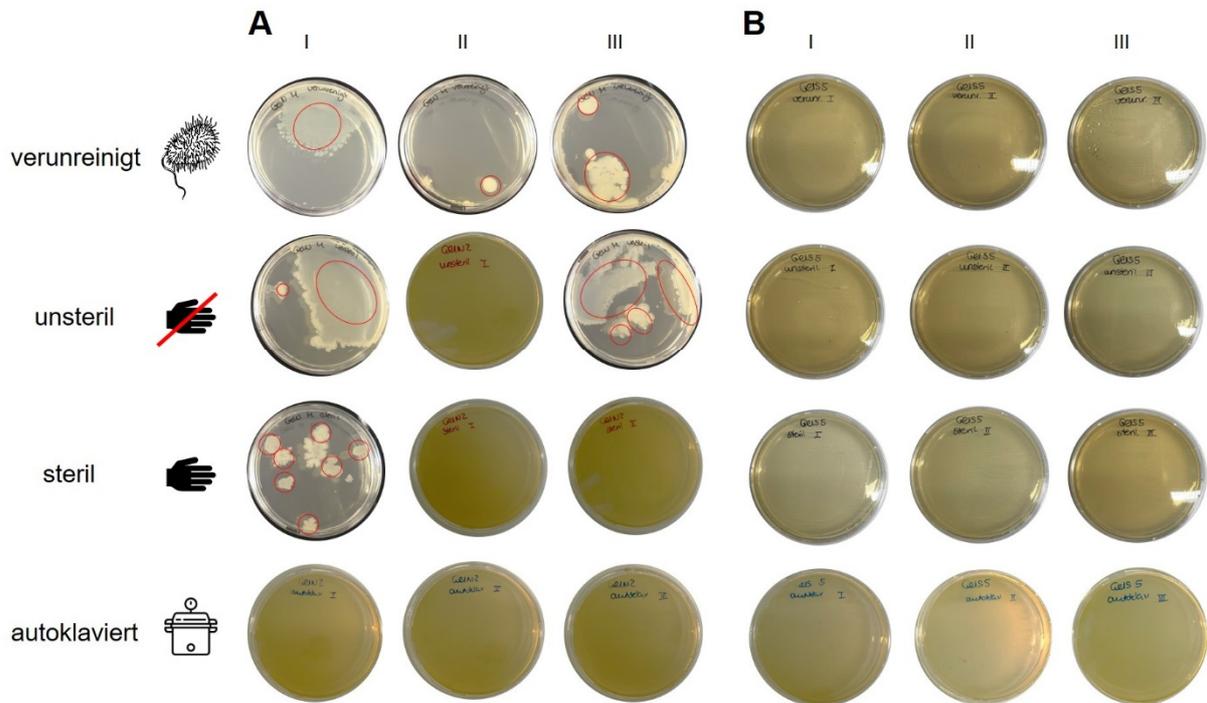


Abbildung 31: Überprüfung der Sterilität verschieden gehandhabter GelNB- und GelS-Lösungen. Für GelNB zeigten nur die autoklavierten Lösungen zuverlässige Keimfreiheit. Das ausplattierte GelS führte nicht zu Kontaminationen. (A) GelNB, (B) GelS.

Für GelNB *Medium* zeigten sich Kontaminationen auf allen mit der verunreinigten Lösung behandelten Agarplatten. Die steril hergestellte Stammlösung zeigte weniger Kontaminationen als die unsteril eingewogene. Dies ist jedoch nicht ausreichend, da nur durch eine sterile Handhabung Verunreinigungen, welche schon zuvor, zum Beispiel während des Gefriertrocknens des Photopolymers, eingetragen wurden eine Kontamination der Lösung nicht ausschließen. Durch Autoklavieren konnten Kontaminationen auch in GelNB *Medium* verhindert werden. Auf den in Abbildung 31 dargestellten Agarplatten, die mit GelS *Medium* behandelt wurden, zeigten sich keine Kontaminationen. Da Thiole eine toxische Wirkung auf Organismen haben können, wurde davon ausgegangen, dass sich dies positiv auf die Sterilität ausgewirkt hat.¹³⁰ Dennoch sollte nicht davon ausgegangen werden, dass dies ausreicht um sterile Bedingungen in der Lösung zu haben. Im Hinblick auf die Sterilität zeigte sich auch für GelNB und GelS, dass Autoklavieren eine geeignete Methode ist. Die Überprüfung der Sterilität von GelNB *Low* und *High*, sowie GelS *Low* ist in Abbildung 104 und Abbildung 105 (Anhang) gezeigt.

3.3.6 Fazit

Das Autoklavieren von Gelatine-basierten Photopolymeren, welche sich zuverlässig und reproduzierbar zum Hydrogel vernetzen lassen sollen, führt zu erheblichen Veränderungen in den wichtigen Eigenschaften. Im Falle der niedrig funktionalisierten Photopolymere GelMA1.0 und GelNB/GelS *Low* war keine Polymerisation mehr möglich. Zusätzlich führte das Autoklavieren bei allen vernetzten Gelen zu verminderten Speichermodulen, was auf eine geringere Stabilität schließen lässt. Auch das Absinken der Geliertemperatur um etwa 10 °C impliziert eine strukturelle Veränderung der Gelatine. Lediglich im Hinblick auf die Sterilität erwies sich das Autoklavieren als erfolgreich. Eine hohe Reproduzierbarkeit und hohe Konstanz der Materialeigenschaften sind unerlässliche Voraussetzungen für den Einsatz im *Tissue Engineering*.¹⁰⁰ Da die vernetzten Gele das Verhalten von Zellen durch ihr Gelatinerückgrat und die viskoelastischen Eigenschaften beeinflussen, ist das Autoklavieren zur Sterilisation nicht geeignet.¹⁸⁹ Weiter sollte auf das wiederholte erwärmen von Stammlösungen verzichtet werden um eine Konstanz der Materialeigenschaften zu ermöglichen. In allen Experimenten mit Kontakt zu Zellen wurden Stammlösungen verwendet, die unter möglichst keimfreien Bedingungen in sterilem DPBS^{-/-} angesetzt wurden. Die Konstanz der Materialeigenschaften wurde höher Priorisiert als die Sterilität, da ausschließlich Zellkulturmedium verwendet wurde, welches Antibiotika enthielt. Damit konnte verhindert werden, dass in den Experimenten Kontaminationen auftraten.

3.4 Biokompatibilität von GelMA und GelNB/GelS

Damit Hydrogele im *Tissue Engineering* erfolgreich eingesetzt werden können, müssen sie nicht nur in Bezug auf ihre Materialeigenschaften kontrollierbar und charakterisiert sein, sondern auch auf ihre biologische Eignung hin untersucht werden. Hierzu gehören zum einen die toxikologische Analyse ihrer Bestandteile, Zusatzkomponenten wie Photoinitiatoren, ihrer Abbauprodukte sowie die Bestimmung eines Zellzahlbereiches, in dem Zellen erfolgreich in den Gelen kultiviert werden können. Zum anderen müssen biokompatible Hydrogele die Diffusion von Nährstoffen und Gasen ermöglichen, um eine Versorgung der eingekapselten Zellen zu gewährleisten. In vorangegangenen Arbeiten wurden die Einzelkomponenten der Hydrogele bereits toxikologisch analysiert.^{130,157} Für den zur Polymerisation eingesetzten Photoinitiator LAP wurde nach 24-stündiger Exposition von HepG2 eine letale Dosis 50 (LD₅₀) von 0,19 % ermittelt.¹³⁰ Die toxikologische Untersuchung der Photopolymerlösungen an HepG2 (5 % in DPBS^{-/-}) zeigte, dass die LD_{50/5%} von GelMA nach kürzeren Expositionszeiten erreicht wird, als für GelNB/GelS.^{154,157} Diese Ergebnisse zeigten bereits eine höhere Biokompatibilität von GelNB/GelS gegenüber GelMA.¹⁵⁴ Vor genauerer Betrachtung von eingekapselten NHDF unter verschiedenen Bedingungen, wurde die Toxizität von Abbauprodukten und Bestandteilen der Hydrogele analysiert.

3.4.1 Toxizität von Abbauprodukten

Die Abbauprodukte von Hydrogelen entstehen unter anderem durch Proteasen, die das Gelatinerückgrat der Hydrogele abbauen.^{1,77} Dadurch werden Bruchstücke der Gele frei, welche zum Beispiel vernetzte und nicht-vernetzte photoreaktive Gruppen enthalten können. Neben den Abbauprodukten können die untersuchten Proben auch Reste des eingesetzten Photoinitiators enthalten. Da vielen Zellkulturmedien fetales Kälberserum (engl.: *fetal calf serum*, FCS) zugesetzt wird und darin Proteasen enthalten sind, werden die Gelatine-basierten Hydrogele nicht nur durch darin enthaltene Zellen, sondern auch durch das Medium selbst abgebaut.¹⁹¹ Diese Abbauprodukte dürfen keinen toxischen Effekt auf die eingekapselten Zellen haben, da die Abbauprodukte bis zum nächsten Mediumwechsel in der Umgebung der Zellen verbleiben. Zusätzlich zu den Abbauprodukten durch das Zellkulturmedium, muss auch gewährleistet sein, dass die Abbauprodukte, die von den eingekapselten Zellen verursacht werden, keinen toxischen Effekt auf Zellen haben. In einem ersten Schritt wurde untersucht, ob sich durch Inkubation der Hydrogele im verwendeten Medium DMEM mit 10 % FCS für NHDF toxische Abbauprodukte bilden. In einem späteren Experiment wurden NHDF in die zu untersuchenden Hydrogele eingekapselt und die Gele unter Zellkulturbedingungen kultiviert. Das Vorgehen ist in Abbildung 32 gezeigt.

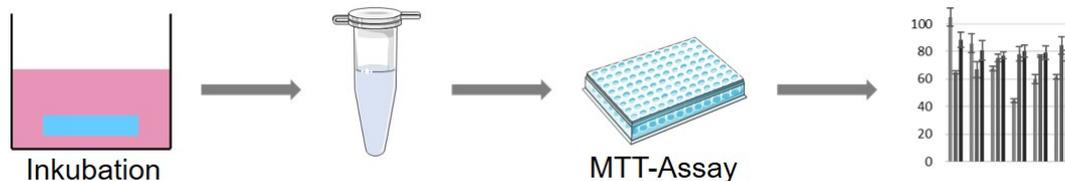
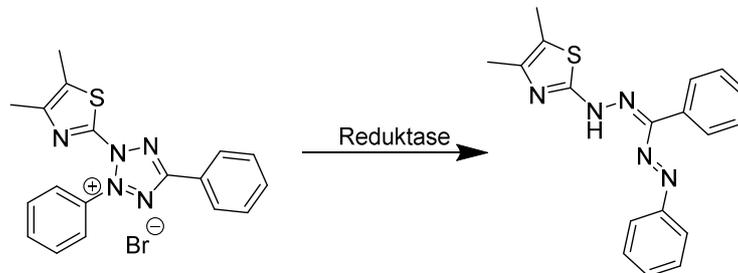


Abbildung 32: Vorgehen zur Bestimmung der Toxizität von Hydrogelabbauprodukten. Die vernetzten Gele wurden in DMEM (10 % FCS, 1 % P/S) inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten das Medium zur Analyse entnommen und durch frisches ersetzt. Die aus dieser Lavage erhaltenen Proben wurden mit einem MTT-Assay bezüglich ihrer Toxizität untersucht.

3.4.1.1 Toxizität nicht-zellulärer Abbauprodukte

Zur Erzeugung der Abbauprodukte wurden die Hydrogele ohne Zellen unter sterilen Bedingungen hergestellt. Hierzu wurde eine 10 %ige Stammlösung des jeweiligen Gels mit LAP und DMEM auf 5 % verdünnt und mit einem Volumen von je 200 μL in einer Kavität eines 8-Well μ -slides der Firma Ibidi GmbH ausgehärtet (Omniculture S2000, 500 mW/cm^2 , 320-500 nm). Die polymerisierten Gele wurden entnommen, in einer 24-Well Platte in je 700 μL DMEM (10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S)) eingelegt und bei 37 °C, 5 % CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (3 h, 24 h, 3 Tage, 7 Tage, 14 Tage, 21 Tage) wurde das Medium entnommen und durch frisches Medium ersetzt, zwischen Tag 14 und Tag 21 erfolgte ebenfalls ein Mediumwechsel. Zur Bestimmung der Toxizität wurden mit den erhaltenen Lösungen ein MTT-Assay durchgeführt. Hierzu wurden $0,5 \times 10^4$ NHDF/Well in einer 96-Well Platte ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Das Medium

der Kontrollen wurde gewechselt und die NHDF für 72 Stunden mit den entnommenen Proben behandelt. Vor der Behandlung wurden die Proben 1:10 verdünnt, um einem Viabilitätsverlust durch Mediummangel vorzubeugen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das gelbe Reagenz 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zugegeben. MTT wird von metabolisch aktiven Zellen zum violetten Farbstoff Formazan umgebaut (Schema 8).



Schema 8: Reduktion des gelben Farbstoffes MTT zu dem violetten Formazan.

Durch Lyse der Zellen wurde das Formazan in Lösung gebracht und die Absorption bei 595 nm mit einem Mikroplattenleser bestimmt. Da die Absorption von Formazan in direktem Zusammenhang mit dem Anteil lebender Zellen steht, konnte der Anteil lebender Zellen im Vergleich zur Kontrolle bestimmt werden. Die erhaltenen Viabilitäten sind in Abbildung 33 dargestellt.

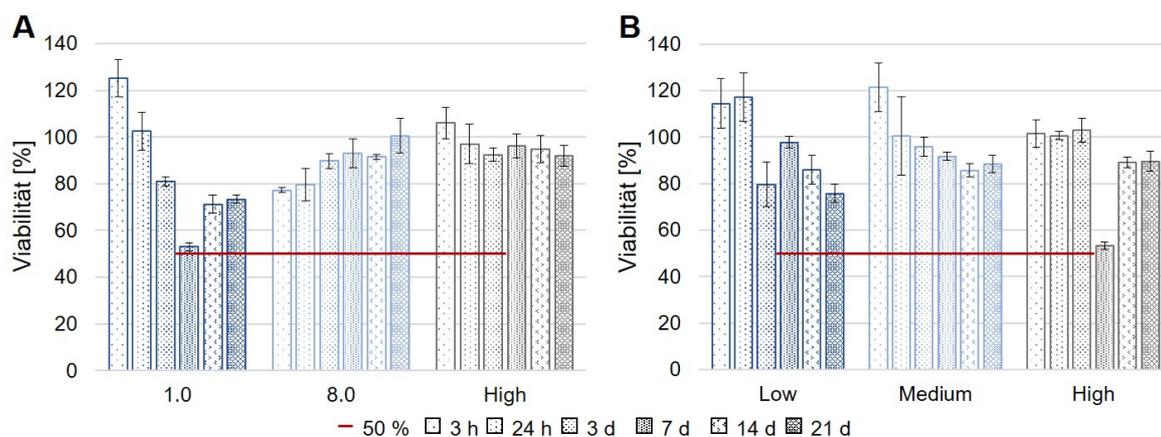


Abbildung 33: Ergebnisse des MTT-Assays zur Bestimmung der Toxizität von nicht-zellulären Abbauprodukten von GelMA und GelINB/GelS auf NHDF. Die vernetzten Gele wurden in DMEM mit 10 % FCS inkubiert. Die Probenentnahme erfolgte nach 3 h, 24 h, 3 Tagen, 7 Tagen, 14 Tagen und 21 Tagen. (A) GelMA, (B) GelINB/GelS. Die NHDF wurden für 72 Stunden mit den Proben behandelt. Die Bestimmung erfolgte als test-over-control gegenüber einer unbehandelten Kontrolle. Der Mittelwert wurde mit $n=3$ berechnet, die Standardabweichung mit $n-1$.

Die erhaltenen Viabilitäten für Abbauprodukte von GelMA sind in Abbildung 33A gezeigt. Für GelMA1.0 zeigte sich die höchste Viabilität mit 140 % für die nach 3 Stunden entnommene Probe, die geringste Viabilität mit 52 % zeigte sich nach der Behandlung mit der nach 7 Tagen entnommenen Probe. Die ermittelte Viabilität lag für alle Entnahmezeitpunkte über 50 %, die LD_{50} der Abbauprodukte wurde also im untersuchten Zeitraum nicht erreicht. Aus vorangegangenen Arbeiten ist bekannt, dass GelMA1.0 in DMEM mit 10 % FCS und 1 % P/S

nach 7 Tagen vollständig abgebaut ist.¹³⁰ Dies erklärt, warum die Viabilität nach 7 Tagen wieder zunimmt. Die Untersuchung der Abbauprodukte von GelMA8.0 zeigte ansteigende Viabilitäten mit längerer Inkubationszeit. Da GelMA8.0 stärker vernetzt ist, baut es sich langsamer ab. Alle ermittelten Viabilitäten für GelMA8.0 lagen über 70 %. Die ermittelten Viabilitäten für GelMA *High* lagen für alle Entnahmezeitpunkte über 90 %. Da sich GelMA *High* langsamer abbaut, als GelMA1.0 und GelMA8.0, waren hier weniger Abbauprodukte in der Lösung vorhanden.^{130,192} Mit der hier durchgeführten Probenvorbereitung und dem MTT-Assay konnte keine Aussage darüber getroffen werden, wann und ob die letale Dosis 50 der Abbauprodukten erreicht wird. Bei Betrachtung der erhaltenen Viabilitäten für die Abbauprodukte von GelNB/GelS (Abbildung 33B) fällt auf, dass diese insgesamt über denen von GelMA lagen. Die Viabilitäten für GelNB/GelS *Low* zeigten gleichbleibend hohe Werte über 80 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Ebenso lagen die Viabilitäten für GelNB/GelS *Medium* und *High* über 90 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Eine Aussage wann und ob die letale Dosis erreicht wird, konnte erneut nicht getroffen werden, es war kein abnehmender Trend der Viabilitäten im betrachteten Zeitraum erkennbar. Dass die Abbauprodukte von GelNB/GelS die Viabilität weniger stark negativ beeinflussten als die von GelMA konnte unter anderem damit erklärt werden, dass die zur Vernetzung benötigte Menge Photoinitiator für GelNB/GelS nur ein Zehntel derer von GelMA beträgt. Da der Photoinitiator teilweise in den polymerisierten Gelen verbleibt, kann dies die Viabilität beeinflussen. Für die Photopolymere GelNB und GelS liegt außerdem eine niedrigere Toxizität als für GelMA vor.¹⁵⁷ Da nicht alle photoreaktiven Gruppen bei der Vernetzung miteinander reagieren, können auch diese zytotoxisch wirken, da sie ebenfalls in den Abbauprodukten vorkommen können. Die erhaltenen Viabilitäten verdeutlichten die hohe Biokompatibilität der beiden Hydrogele, wobei erkennbar war, dass GelNB/GelS gegenüber GelMA eine höhere Biokompatibilität im Hinblick auf die Toxizität der Abbauprodukte aufwies. Somit wurde davon ausgegangen, dass sich GelNB/GelS besonders gut für den Einsatz in Verbindung mit empfindlichen Primärzellen eignet.

3.4.1.2 Toxizität zellulärer Abbauprodukte

Für die Beurteilung, wie sich zelluläre Abbauprodukte auf die Viabilität von Zellen auswirken, wurden GelMA und GelNB/GelS Hydrogele hergestellt, welche $2,5 \times 10^6$ NHDF/ml enthielten (Kapitel 6.17.2). Analog zum Vorgehen für die Gele ohne Zellen, wurden Proben entnommen und auf ihre Toxizität mit dem MTT-Assay untersucht. Für den MTT-Assay wurden $0,5 \times 10^4$ NHDF/Well in einer 96-Well Platte ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden wurde in den Kontrollen das Medium gewechselt und die NHDF mit den Abbauprodukten behandelt (1:10 Verdünnung). Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurde MTT zugegeben und die Viabilität durch Absorptionsmessung bei 595 nm bestimmt. Die erhaltenen Viabilitäten sind in Abbildung 37 gezeigt.

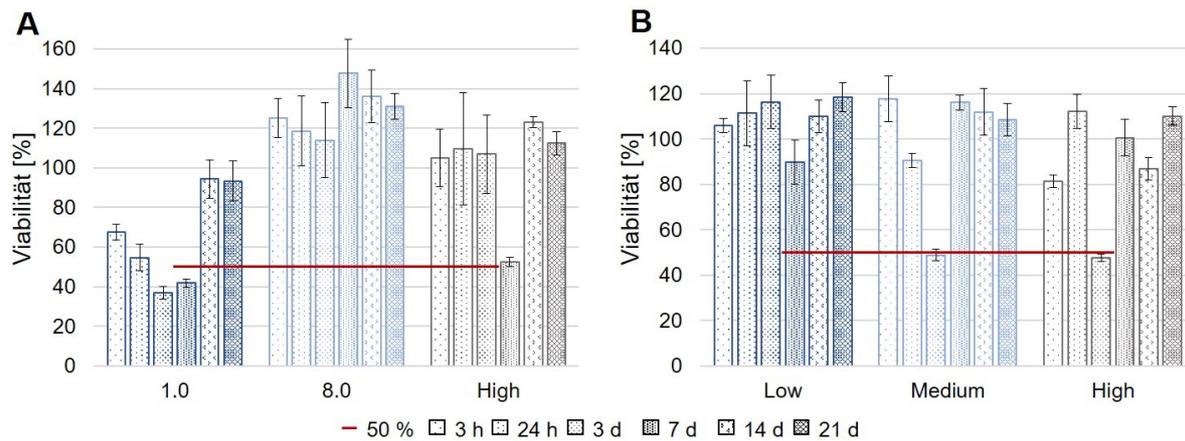


Abbildung 34: Ergebnisse des MTT-Assay zur Bestimmung der Toxizität von zellulären Abbauprodukten (NHDF) von GelMA und GelNB/GelS auf NHDF. Die zellenthaltenden vernetzten Gele wurden in DMEM (10 % FCS, 1 % P/S) inkubiert. Die Probenentnahme erfolgte nach 3 h, 24 h, 3 Tagen, 7 Tagen, 14 Tagen und 21 Tagen. (A) GelMA, (B) GelNB/GelS. Die NHDF wurden für 72 Stunden mit den Proben behandelt. Die Bestimmung erfolgte als test-over-control gegenüber einer unbehandelten Kontrolle. Der Mittelwert wurde mit $n=3$ berechnet, die Standardabweichung mit $n-1$.

Wie schon für die nicht-zellulären Abbauprodukte wurde die geringste Viabilität für GelMA1.0 ermittelt. Ebenso zeigte sich hier ein Anstieg der Viabilität für die Probenzeitpunkte Tag 7 < Tag 14 < Tag 21. Da aus vorigen Arbeiten für GelMA1.0 bekannt ist, dass das Gel ohne Zellen nach 7 Tagen in DMEM mit 10 % FCS und 1 % P/S abgebaut ist, war davon auszugehen, dass nach 7 Tagen kein Gel mehr vorlag und keine Abbauprodukte mehr entstanden. Die letale Dosis der Abbauprodukte wurde also für GelMA1.0 bereits für eine Inkubationszeit bei der Generierung der Abbauprodukte von weniger als 7 Tagen erreicht. Für GelMA8.0 und GelMA High lagen die Viabilitäten deutlich über 50 %. Lediglich für den Entnahmezeitpunkt 7 Tage wurde eine Viabilität von unter 50 % für GelMA High festgestellt. Ein vollständiger Abbau der Gele bis Tag 7 konnte als Ursache ausgeschlossen werden.¹³⁰

Bei den ermittelten Viabilitäten für GelNB/GelS konnte kein Unterschied in den einzelnen Funktionalisierungsgraden festgestellt werden. Die Viabilitäten lagen auch hier mit wenigen Ausnahmen deutlich über 50 %. Verglichen mit GelMA wurden niedrigere Viabilitäten ermittelt, wann und ob die letale Dosis von Abbauprodukten von GelNB/GelS erreicht wird konnte jedoch mit diesem Experimentaufbau nicht bestimmt werden. Insgesamt bestätigten die Ergebnisse der MTT-Assays die hohe Biokompatibilität beider Hydrogele, wobei sich GelNB/GelS als vorteilhafter erwies. Da sich die Ergebnisse aus einem 2D Assay nur bedingt auf die 3D Umgebung übertragen lassen, wurden zur weiteren Beurteilung der Biokompatibilität NHDF in die Hydrogele eingekapselt und die Viabilität, die Elongation und Bildung von Zell-Zell-Kontakten unter bestimmten Bedingungen durch eine Färbung des Zytosols visualisiert.

3.4.2 3D Einbettung von Fibroblasten

NHDF eignen sich gut als Modellorganismus, da sie nicht immortalisiert sind, die metabolische Aktivität des Ursprungsgewebes aufweisen und sich einfach in großer Zahl kultivieren lassen.¹⁹³ Fibroblasten eignen sich als Modellorganismus auch auf Grund ihrer Größe, da die Ausrichtung und Bildung von Zell-Zell-Kontakten gut sichtbar gemacht werden können.^{193,194} Fibroblasten sind ortsständige Zellen des Bindegewebes. Ihre Hauptaufgabe besteht im Auf- und Umbau der zellumgebenden Matrix durch die Sekretion von strukturgebenden Proteinen wie Kollagen und Proteoglykanen.^{195,196} Gelatine-basierte Hydrogele ermöglichen eine Interaktion von Zellen mit den in der Gelatine enthaltenen Zellinteraktionsdomänen, wie der RGD-Domäne.^{1,152} Über Integrinrezeptoren können Zellen an die Matrix adhären und sich daran ausrichten (Abbildung 35A). Diese Ausrichtung konnte für Hautfibroblasten, neben der Viabilität, als Maß für deren korrekte Funktion gesehen werden, da es sich bei Fibroblasten um ortsständige Zellen des Bindegewebes handelt. Zusätzlich bilden Fibroblasten Zell-Zell-Kontakte untereinander aus. Bei Kontakt mit anderen Fibroblasten bilden sie *Tight Junctions*. Diese festen Zell-Zell-Verbindungen sorgen, neben dem Vorkommen strukturgebender Proteine wie Kollagen, für die Festigkeit des Bindegewebes.¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ Somit konnte auch eine starke Bildung von Zell-Zell-Kontakten als Maß für die Biokompatibilität eines Hydrogels gegenüber Fibroblasten angesehen werden. Damit Zellen eine Matrix durchdringen und Zell-Zell-Kontakte ausbilden können, muss die Matrix ab- und umbaubar sein. Gelatine-basierte erfüllen diese Voraussetzung, da in der Gelatine Matrix-Metallo-Protease-Schnittstellen vorhanden sind. Zur Beurteilung der Biokompatibilität wurden NHDF in die Hydrogele eingekapselt (Abbildung 35B) und ihr Zytosol zur Visualisierung gefärbt.

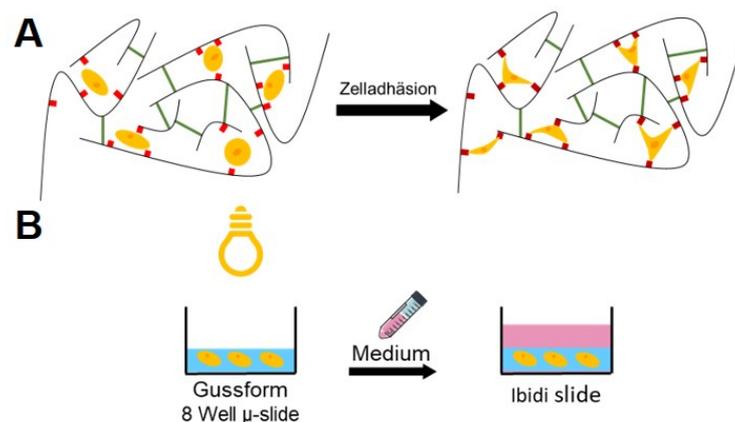


Abbildung 35: (A) Schematische Darstellung von in einem Hydrogel eingekapselten Zellen. Sind im Hydrogel Zellinteraktionsdomänen, wie die RGD-Domäne, vorhanden können die Zellen adhären und sich an der Matrix ausrichten. (B) Schematische Darstellung der Einkapselung von Zellen. Die Zellen wurden in der Photopolymerlösung resuspendiert und die Lösung zum Hydrogel in einer Form polymerisiert. Das polymerisierte Hydrogel wurde zur Versorgung der Zellen mit Medium überschichtet.

3.4.2.1 GelMA

In einer vorangegangenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich NHDF in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml in GelMA und GelNB/GelS erfolgreich über 21 Tage kultivieren lassen. NHDF, die in GelNB/GelS eingebettet wurden, zeigten höhere Viabilitäten und Proliferationsraten als die in GelMA eingebetteten NHDF.^{130,154} Aufbauend auf diesen Ergebnissen, wurde die Zellzahl der in den Hydrogelen eingebetteten Zellen reduziert, um zu untersuchen, ob durch die größeren Entfernungen eine schnellere Adhäsion und Elongation der NHDF, sowie eine beschleunigte Bildung von Zell-Zell-Kontakten erreicht werden kann. Gleichzeitig diente die Verminderung der Zellzahl dazu, zu beurteilen, ob die Lebensdauer der Gele dadurch verlängert werden kann.

Zur Einbettung der Zellen in die Hydrogele wurden diese mit der jeweiligen flüssigen Photopolymerlösung gemischt, sodass Zellkonzentrationen von $0,25 \times 10^6$ Zellen/ml, $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml und $1,25 \times 10^6$ Zellen/ml in den Gelen vorlagen. Nach dem Vernetzen wurden die Gele mit DMEM (engl.: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) überschichtet und bei 37°C , 5 % CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Durch das Mischen der Zellsuspension mit der Photopolymerlösung konnte eine homogene Verteilung der NHDF im Hydrogel gewährleistet werden. Zur Visualisierung der eingebetteten Zellen wurde an Tag 0, 7, 14 und 21 jeweils eine Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM (4 μM) und Propidiumiodid (PI, 0,02 mg/ml) durchgeführt. Das nicht-fluoreszente Calcein-AM wird von viablen Zellen durch Esterasen in den grün fluoreszierenden Farbstoff Calcein umgewandelt, der rot fluoreszierende Farbstoff PI kann nur von porösen nekrotischen Zellen aufgenommen werden und in die DNA dieser Zellen interkalieren. Die Auswertung erfolgte mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica TCS SPE, Leica Stellaris 5, Leica Microsystems), wobei viable Zellen grün fluoreszierten und nekrotische Zellen rot. Die aufgenommenen Z-Stacks (Höhe 300 μm , Schrittgröße 5 μm) wurde mit der Software Leica LasX 3D rekonstruiert. In Abbildung 36 sind die Ergebnisse der Lebend-Tot-Färbung der in GelMA1.0 eingebetteten NHDF gezeigt.

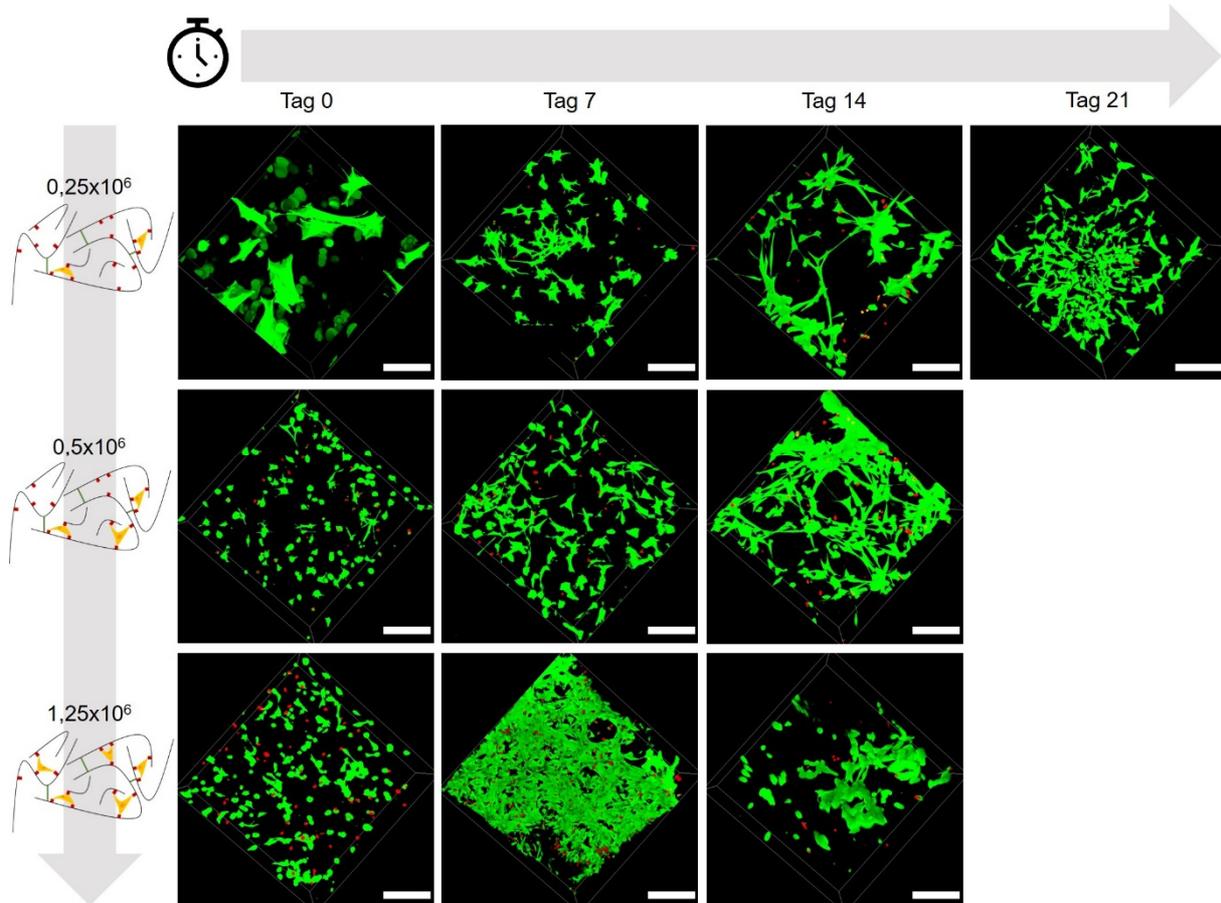


Abbildung 36: Lebend-Tot-Färbung von NHDF in GelMA1.0 zu den Zeitpunkten Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Die NHDF wurden in unterschiedlichen Konzentrationen in GelMA eingebettet. Die Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM (grün) und PI (rot) wurde durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie visualisiert (Leica TCS SPE, 10x Objektiv, Zoom 1,5, grün Ex. 488 nm, Em. 495-584 nm; rot Ex. 532 nm, Em. 610-700 nm). Es wurden Z-Stacks mit einer Höhe von 300 μm aufgezeichnet (Schrittgröße 5 μm). Die Rekonstruktion der Z-Stacks zur 3D Anordnung erfolgte mit der Software Leica LasX. Maßstab 200 μm .

Bereits zum Zeitpunkt Tag 0 konnten ausgerichtete NHDF in GelMA1.0 detektiert werden. Mit zunehmender Dauer der Kultivierung verstärkten sich Ausrichtung und Bildung von Zell-Zell-Kontakten. Die Gele mit nur $0,25 \times 10^6$ Zellen/ml konnten über 21 Tage mit hoher Viabilität kultiviert werden. Mit Zunahme der Zellzahl war eine Kultivierung nur noch bis Tag 14 möglich. Für $1,25 \times 10^6$ Zellen/ml zeigten sich bereits an Tag 7 stark ausgebildete Zell-Zell-Kontakte zwischen den NHDF. An Tag 14 konnten nur noch Bruchstücke des Geles gefärbt werden. Da Fibroblasten maßgeblich die Struktur einer umgebenden Matrix beeinflussen, ist anzunehmen, dass sie die Gele stabilisieren. Sind Fibroblasten nicht in ausreichender Zahl vorhanden, verlieren die Gele mit zunehmender Zeit an Stabilität, da die umgebende Matrix schneller abgebaut wird, als neues Material aufgebaut wird. Dies erklärt, warum in der Vergangenheit bereits NHDF in doppelter Konzentration über 21 Tage erfolgreich in GelMA1.0 kultiviert werden konnten.¹³⁰ Der Auf- und Abbau der umgebenden Matrix durch Fibroblasten geschieht im Gleichgewicht, das Gel bleibt stabil. Sind ausreichend wenig Fibroblasten vorhanden, dann sind die Gele ebenfalls über 21 Tage stabil.

In Abbildung 37 und Abbildung 38 sind die Ergebnisse der Lebend-Tot-Färbung von eingebetteten Fibroblasten in GelMA8.0 und GelMA *High* gezeigt. Für beide Hydrogele zeigen sich an Tag 0 keine ausgerichteten Fibroblasten, was auf die stärkere Vernetzung des Gels zurückzuführen ist. Dieser Unterschied konnte auch in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden.¹³⁰

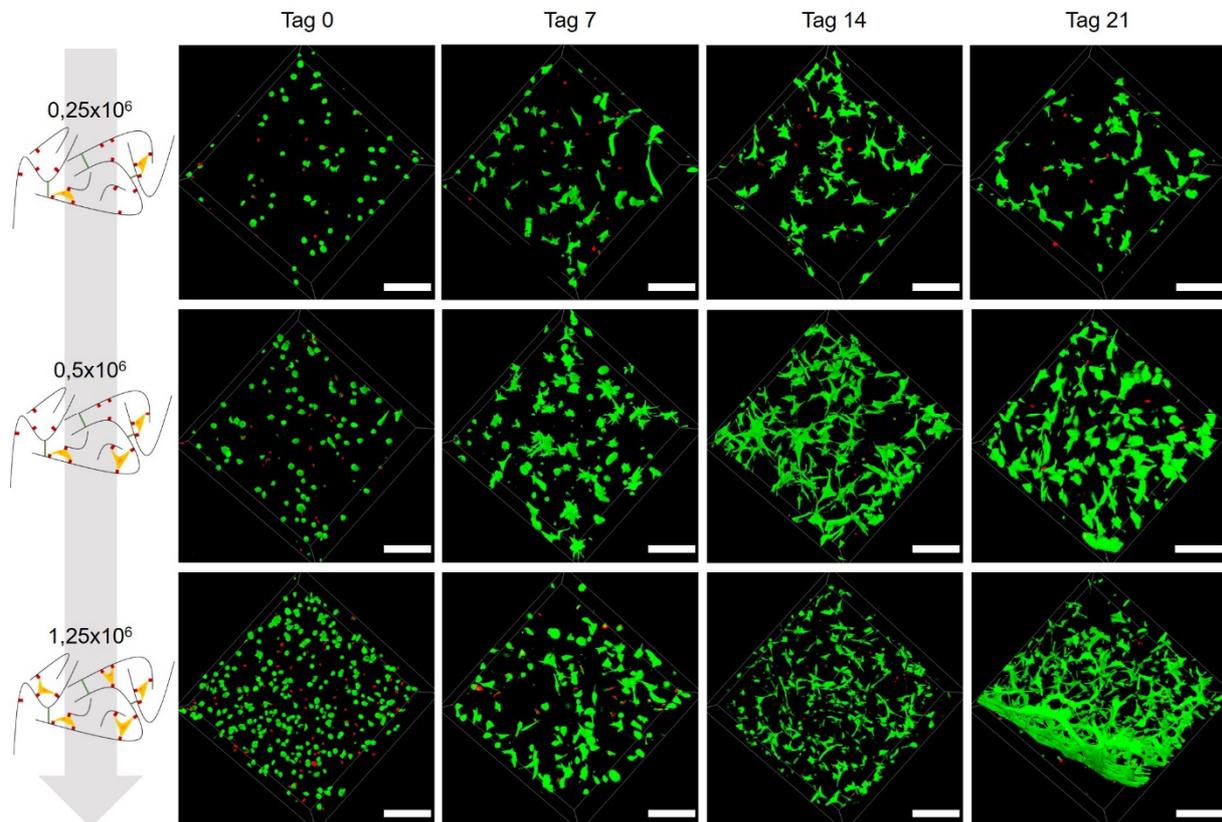


Abbildung 37: Lebend-Tot-Färbung von NHDF in GelMA8.0 zu den Zeitpunkten Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Die NHDF wurden in unterschiedlichen Konzentrationen in GelMA eingebettet. Die Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM (grün) und PI (rot) wurde durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie visualisiert (Leica TCS SPE, 10x Objektiv, Zoom 1,5, grün Ex. 488 nm, Em. 495-584 nm; rot Ex. 532 nm, Em. 610-700 nm). Es wurden Z-Stacks mit einer Höhe von 300 µm aufgezeichnet (Schrittgröße 5 µm). Die Rekonstruktion der Z-Stacks zur 3D Anordnung erfolgte mit der Software Leica LasX. Maßstab 200 µm.

Eine Kultivierung der zellbeladenen Gele über 21 Tage war möglich. Alle eingesetzten Zellkonzentrationen führten zu ausgerichteten Fibroblasten, die Zell-Zell-Kontakte ausbildeten. Für GelMA8.0 zeigte sich mit $1,25 \times 10^6$ Zellen/ml eine besonders starke Zunahme der Zell-Zell-Kontakte von Tag 14 bis Tag 21. Verglichen mit den Ergebnissen aus vorangegangenen Arbeiten zeigte sich eine verstärkte Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten. Eine Verminderung der Zellzahl führte also in diesem Fall zu der erwünschten Verstärkung der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten. Eine Beschleunigung der Adhäsion war nicht zu beobachten.

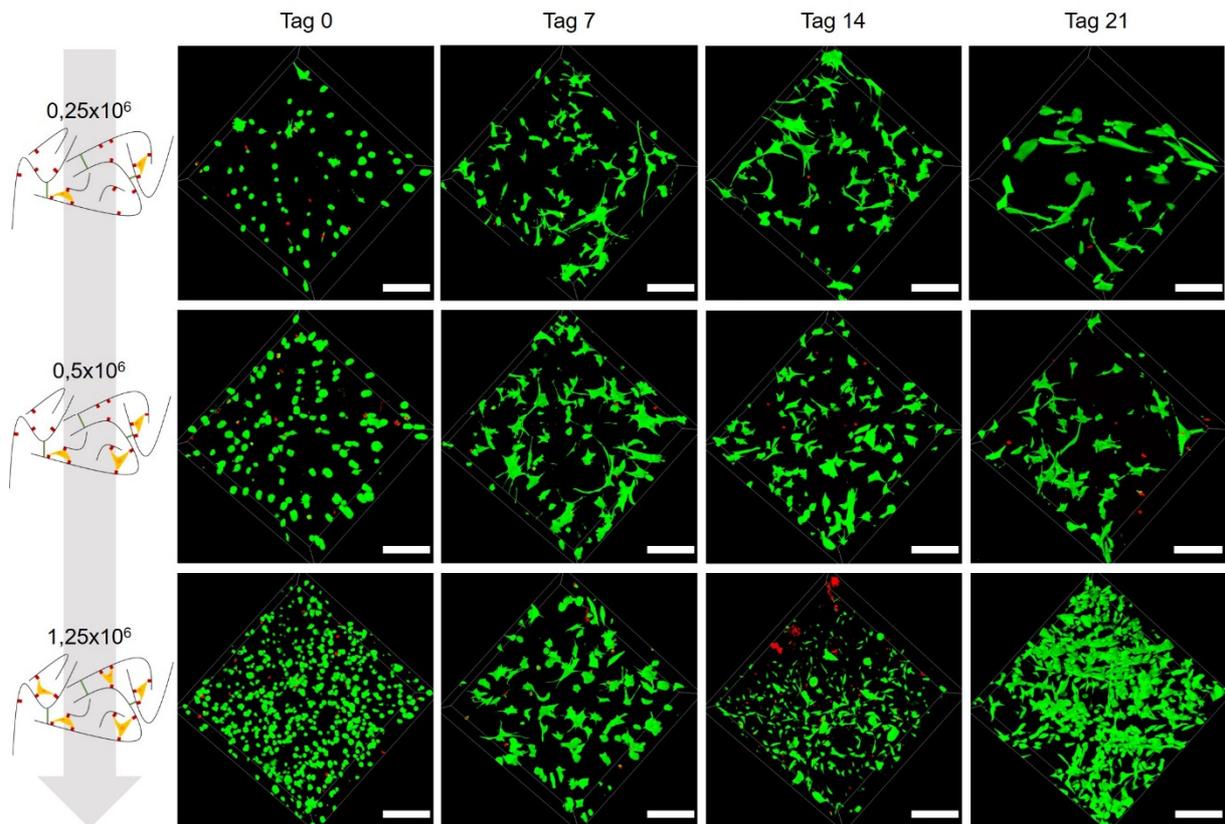


Abbildung 38: Lebend-Tot-Färbung von NHDF in GelMA High zu den Zeitpunkten Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Die NHDF wurden in unterschiedlichen Konzentrationen in GelMA eingebettet. Die Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM (grün) und PI (rot) wurde durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie visualisiert (Leica TCS SPE, 10x Objektiv, Zoom 1,5, grün Ex. 488 nm, Em. 495-584 nm; rot Ex. 532 nm, Em. 610-700 nm). Es wurden Z-Stacks mit einer Höhe von 300 μm aufgezeichnet (Schrittgröße 5 μm). Die Rekonstruktion der Z-Stacks zur 3D Anordnung erfolgte mit der Software Leica LasX. Maßstab 200 μm .

Auch für GelMA High konnte dies beobachtet werden. Alle Zellkonzentrationen sind über 21 Tage kultivierbar, jedoch war besonders für $1,25 \times 10^6$ eine starke Zunahme der Zell-Zell-Kontakte von Tag 14 bis Tag 21 zu erkennen. Im Vergleich zu früheren Studien zeigte sich auch hier eine stärkere Bildung von Zell-Zell-Kontakten in den Gelen mit der halbierten Zellkonzentration. Hinsichtlich der Viabilität ließ sich in keinem Gel eine Zunahme des Anteils der nekrotischen Zellen erkennen. Die Reduktion der eingesetzten Zellkonzentrationen wirkte sich somit nicht negativ auf die Viabilität der Fibroblasten aus.

Die Einbettung von NHDF in GelMA führte in allen Konzentrationen zur Elongation und Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten. In GelMA Medium und GelMA High konnte dieser Effekt durch die Einbettung von weniger NHDF als in vorangegangenen Arbeiten verstärkt beobachtet werden.¹³⁰

3.4.2.2 GeINB/GeIS

Analog zur Einbettung der NHDF in verschiedenen Konzentrationen in GelMA, wurden NHDF in den gleichen Konzentrationen in GeINB/GeIS Hydrogele eingebettet. Die Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM (4 μ M) und PI (0,02 mg/ml) erfolgte ebenfalls zu den Zeitpunkten Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 21, die Auswertung durch Aufnahme von Z-Stacks mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie. In Abbildung 39 sind die in GeINB/GeIS Low eingebetteten NHDF gezeigt.

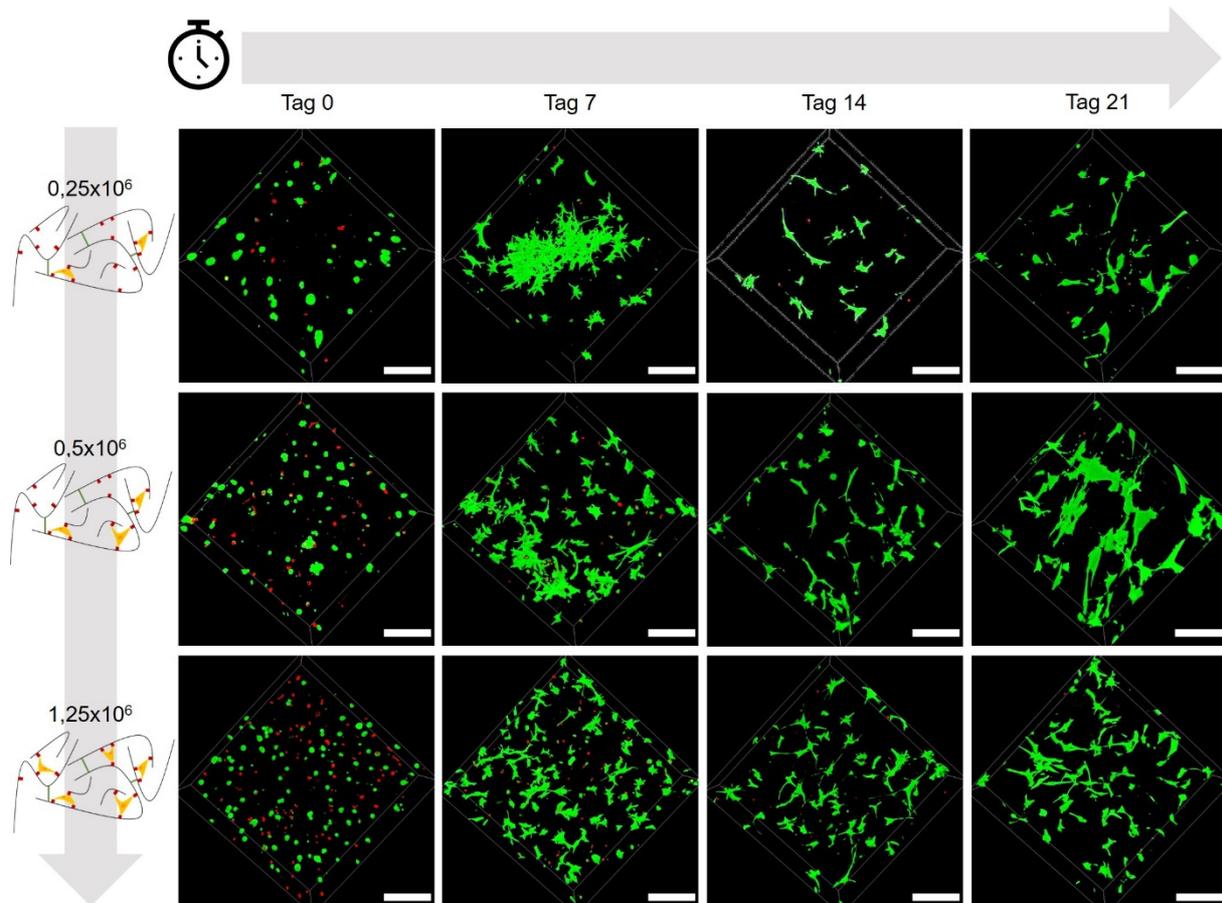


Abbildung 39: Lebend-Tot-Färbung von in GeINB/GeIS Low eingebetteten NHDF ($0,25 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$, $1,25 \times 10^6$ NHDF/ml) mit Calcein-AM (grün) und PI (rot). Die Färbung erfolgte zu den Zeitpunkten Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Die Auswertung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Leica TCS SPE, 10x Objektiv, Zoom 1,5, grün Ex. 488 nm, Em. 495-584 nm; rot Ex. 532 nm, Em. 610-700 nm). Es wurden Z-Stacks mit einer Höhe von 300 μ m aufgezeichnet (Schrittgröße 5 μ m). Die Rekonstruktion der Z-Stacks zur 3D Anordnung erfolgte mit der Software Leica LasX. Maßstab 200 μ m.

In GeINB/GeIS Low konnten NHDF in den untersuchten Konzentrationen über 21 Tage ohne Viabilitätsverluste kultiviert werden. Nach 7 Tagen konnte für die Konzentration von $0,25 \times 10^6$ Zellen/ml eine starke Bildung von Zell-Zell-Kontakten detektiert werden, die jedoch im Verlauf der weiteren Kultivierung nicht zu Konfluenz führte. Dies zeigte sich in etwas schwächerer Form auch für die anderen beiden Konzentrationen. Gegenüber den Ergebnissen aus vorangegangenen Arbeiten konnte keine beschleunigte und verstärkte Ausrichtung und Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten erreicht werden.¹³⁰ Es konnte jedoch gezeigt werden, dass

sich die Lebensdauer der Gele durch eine Reduzierung der enthaltenen Zellen verlängern lies. Abbildung 40 zeigt die Ergebnisse der Einbettung verschiedener Konzentrationen NHDF in GelNB/GelS *Medium*. Auch hier konnte keine Zellausrichtung an Tag 0 durch Reduzierung der Zellkonzentration erreicht werden.

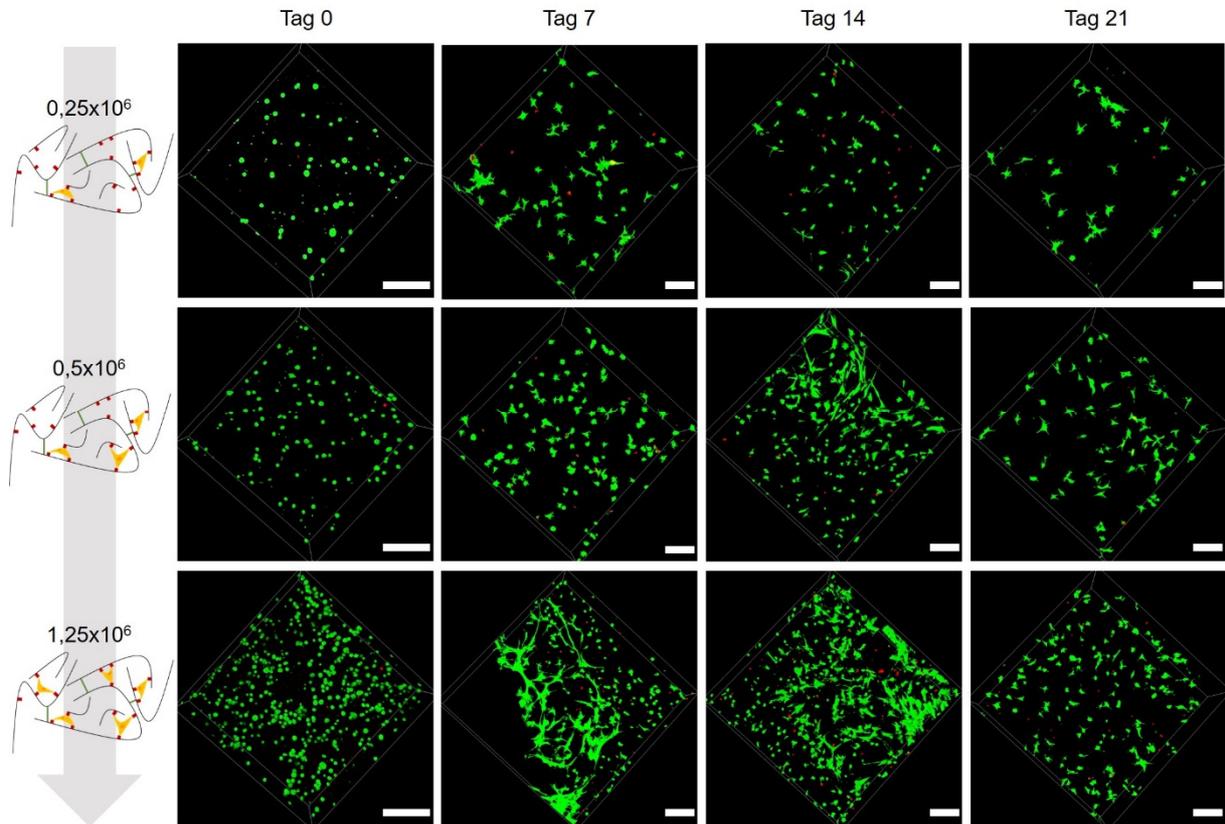


Abbildung 40: Lebend-Tot-Färbung von in GelNB/GelS Medium eingebetteten NHDF mit Calcein-AM (grün) und PI (rot). Die Färbung erfolgte zu den Zeitpunkten Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Die Auswertung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Tag 0 Leica TCS SPE, 10x Objektiv, Zoom 1,5, grün Ex. 488 nm, Em. 495-584 nm; rot Ex.532 nm, Em. 610-700 nm, restliche: Leica Stellaris 5, 10x Objektiv, Zoom 1,0, grün Ex. 494 nm, Em. 499-544 nm; rot Ex. 549 nm, Em. 591-725 nm). Es wurden Z-Stacks mit einer Höhe von 300 μm aufgezeichnet (Schrittgröße 5 μm). Die Rekonstruktion der Z-Stacks zur 3D Anordnung erfolgte mit der Software Leica LasX. Die Einbettung erfolgte in den Konzentrationen $0,25 \times 10^6$ Zellen/ml, $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml und $1,25 \times 10^6$ Zellen/ml. Maßstab 200 μm .

Die Kultivierung der Gele war über einen Zeitraum von 21 Tagen ohne Viabilitätsverluste möglich, eine Ausrichtung der Fibroblasten fand in allen Fällen statt, es konnte jedoch keine Bildung von Zell-Zell-Kontakten erreicht werden. Lediglich für $1,25 \times 10^6$ Zellen/ml konnten Zell-Zell-Kontakte detektiert werden, die mit Zunahme der Kultivierungsdauer jedoch wieder abnahmen. Der Anteil nekrotischer Zellen nahm nicht zu. Gegenüber dem Einsatz von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml zeigte sich kein Vorteil bezüglich der Ausrichtung und der Bildung von Zell-Zell-Kontakten. Die Auswertung der Lebend-Tot-Färbung der NHDF in GelNB/GelS *High* ist in Abbildung 41 gezeigt.

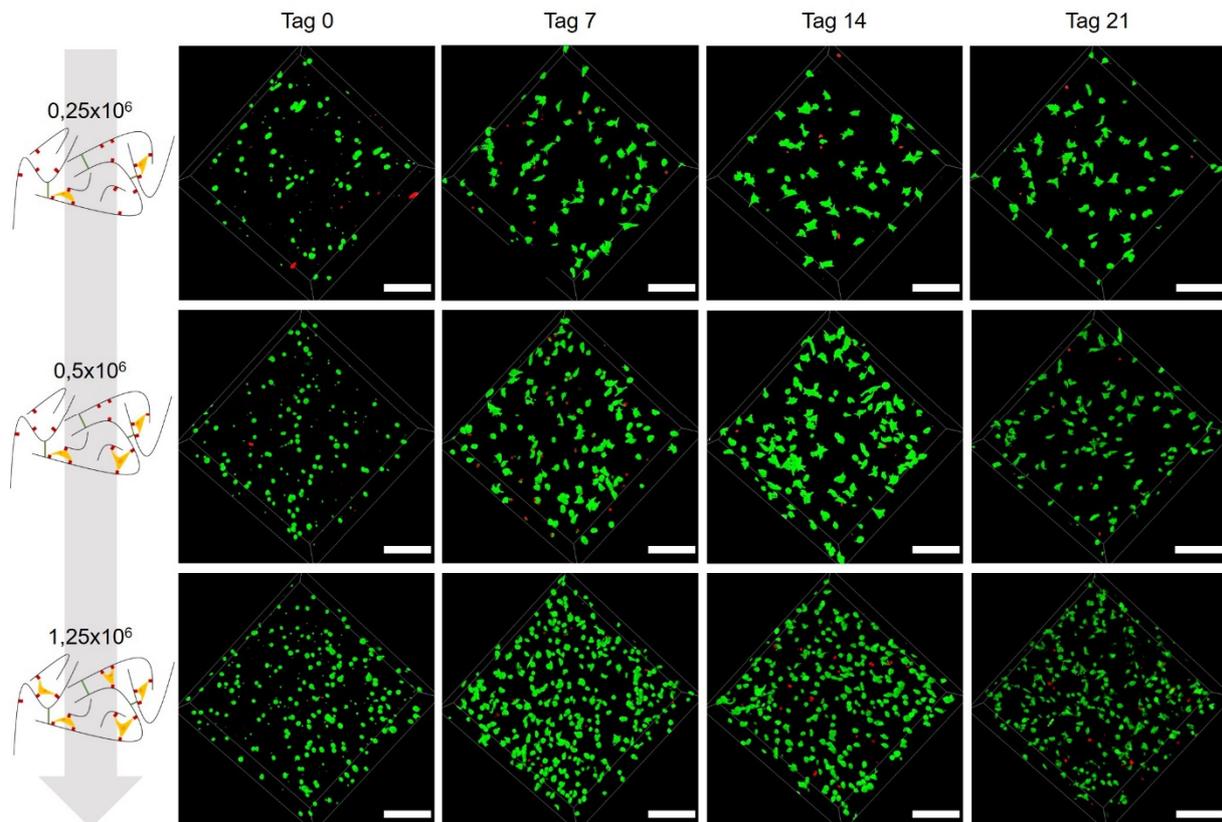


Abbildung 41: Lebend-Tot-Färbung von in GelNB/GelS High eingebetteten NHDF mit Calcein-AM (grün) und PI (rot). Die Färbung erfolgte zu den Zeitpunkten Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Die Auswertung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Leica TCS SPE, 10x Objektiv, Zoom 1,5, grün Ex. 488 nm, Em. 495-584 nm; rot Ex. 532 nm, Em. 610-700 nm). Es wurden Z-Stacks mit einer Höhe von 300 μm aufgezeichnet (Schrittgröße 5 μm). Die Rekonstruktion der Z-Stacks zur 3D Anordnung erfolgte mit der Software Leica LasX. Die Einbettung erfolgte in den Konzentrationen 0,25x10⁶ Zellen/ml, 0,5x10⁶ Zellen/ml und 1,25x10⁶ Zellen/ml. Maßstab 200 μm .

Die Kultivierung der Gele über 21 Tage war für alle Zellkonzentrationen ohne Abnahme der Viabilität möglich. Die Einbettung von 0,25x10⁶ Zellen/ml und 0,5x10⁶ Zellen/ml zeigte an Tag 7 stärker ausgerichtete NHDF als die Einbettung von 1,25x10⁶ Zellen/ml. Für die höchste eingesetzte Konzentration ließ sich auch mit Zunahme der Kultivierungsdauer nur wenige ausgerichtete NHDF detektieren. Eine Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten fand in keinem der untersuchten Hydrogele statt. Werden alle GelNB/GelS Hydrogele betrachtet, so lässt sich durch Reduzierung der Zellzahl kein Vorteil gegenüber früheren Studien erreichen. Lediglich die Lebensdauer von GelNB/GelS Low konnte durch den Einsatz von nur 0,25x10⁶ Zellen/ml verlängert werden, die Bildung von Zell-Zell-Kontakten trat jedoch später auf als bei den Gelen mit höherer Zellkonzentration.

Durch die Reduzierung der Zellzahl konnte die Lebensdauer der gering funktionalisierten Gele GelMA1.0 und GelNB/GelS Low verlängert werden. Eine Verbesserung der Elongation und Bildung von Zell-Zell-Kontakten durch Verminderung der Zellzahl konnte nur für GelMA8.0 und GelMA High erreicht werden. Da die Ausrichtung und die Bildung von Zell-Zell-Kontakten jedoch in allen Hydrogelen beobachtet werden konnte, war die Biokompatibilität insgesamt als

sehr hoch anzusehen. Aus diesem Grund, kann für jedes Experiment individuell entschieden werden, wo der Fokus liegt und welche Zellzahl eingesetzt werden soll.

3.4.3 Proliferation von NHDF in GelMA und GelNB/GelS

Neben der Viabilität, der Ausrichtung und der Bildung von Zell-Zell-Kontakten ist das Proliferationsverhalten der eingekapselten Zellen ein weiterer Faktor um die Biokompatibilität beurteilen zu können.

3.4.3.1 GelMA

Um die Proliferation der NHDF unterschiedlicher Konzentrationen zu quantifizieren, wurden diese in Hydrogele eingebettet und zu den Zeitpunkten Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 der PrestoBlue Assay durchgeführt. Die Einbettung erfolgte in den Konzentrationen $0,25 \times 10^6$ Zellen/ml, $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml und $1,25 \times 10^6$ Zellen/ml durch Mischen der Zellsuspension mit den Photopolymerlösungen und Vernetzung von 100 μ l Lösung/Well in einer 96-Well Platte. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Die Färbung erfolgte mit dem PrestoBlue Reagenz (Molecular Probes). Metabolisch aktive Zellen wandeln das Resazurin-haltige PrestoBlue Reagenz zum fluoreszenten Farbstoff Resorufin um (Abbildung 42A). Die Fluoreszenz des Resorufins wurde mit einem Mikroplattenleser gemessen und so die Veränderung der Fluoreszenz über den Kultivierungszeitraum als Maß für die Proliferation aufgezeichnet. Als Blank dienten Hydrogele ohne Zellen. Die Ergebnisse des PrestoBlue Assays für in GelMA eingebettete NHDF über 21 Tage sind in Abbildung 28 gezeigt.

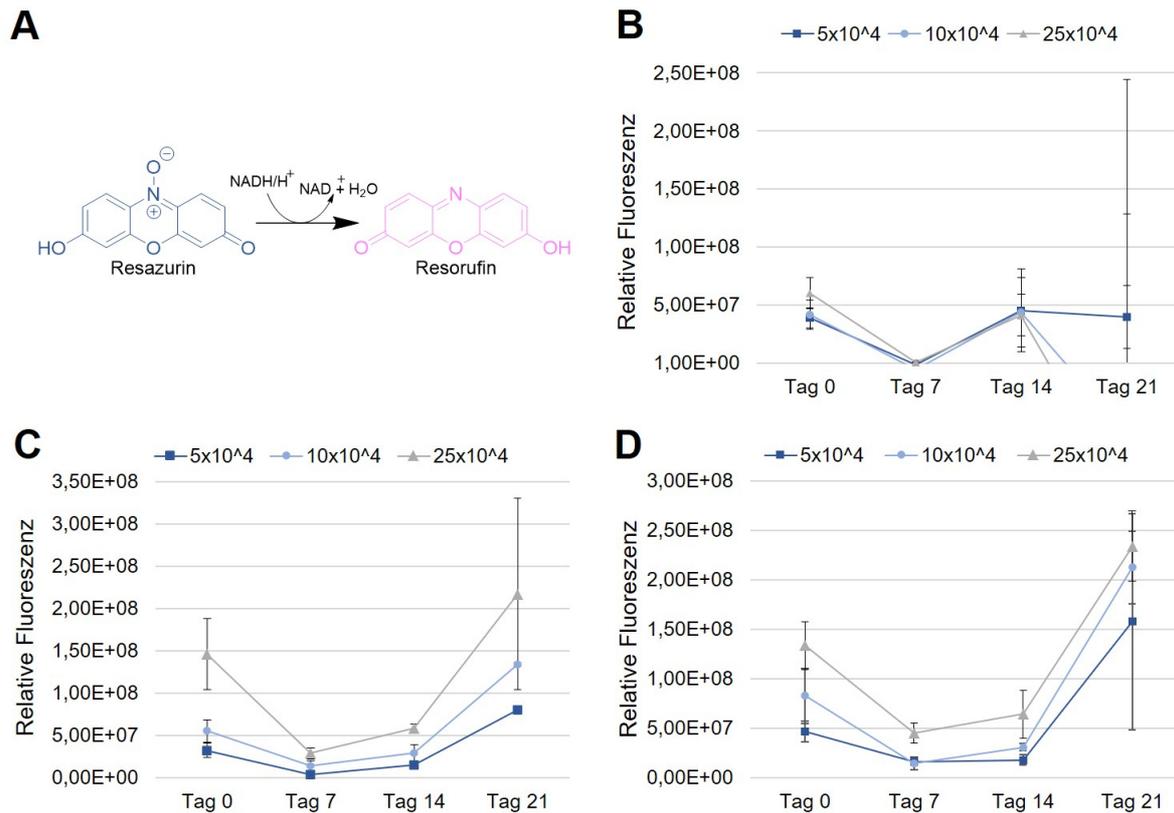


Abbildung 42: PrestoBlue Assay zur Untersuchung der Proliferation von primären Fibroblasten in GelMA. (A) Reduktion von Resazurin durch metabolisch aktive Zellen zum fluoreszierenden Farbstoff Resorufin. (B) Proliferation von NHDF in GelMA1.0. (C) Proliferation von NHDF in GelMA8.0. (D) Proliferation von NHDF in GelMA High. Angegeben ist die Zellzahl für in 200 μ l GelMA eingekapselte NHDF. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten, die Berechnung des Mittelwertes mit $n=3$, die der Standardabweichung mit $n-1$.

Für in GelMA1.0 eingekapselte NHDF (Abbildung 42B) zeigte sich eine gleichbleibende Fluoreszenz von Tag 0 nach Tag 14. Für Tag 21 konnte nur noch für die kleinste Konzentration NHDF eine Fluoreszenz detektiert werden. Dies bestätigte, dass eine Kultivierung von NHDF in GelMA1.0 nicht für alle Zellkonzentrationen über 21 Tage möglich ist. Die gleichbleibende Fluoreszenz bestätigte die Ergebnisse aus Kapitel 3.4.2.1 für GelMA1.0. In GelMA8.0 (Abbildung 42C) eingekapselte NHDF zeigten für alle eingekapselten Konzentrationen eine Zunahme der Fluoreszenz über die Kultivierungsdauer von 21 Tagen. Für die Konzentration von $0,25 \times 10^6$ Zellen/ml nahm die Fluoreszenz auf 248 % des Startwertes von 3×10^7 auf 8×10^7 zu. Für die zweifache Konzentration NHDF zeigte sich ebenfalls eine Fluoreszenzzunahme auf 244 %. Mit einer Zunahme auf 148 % des Startwertes zeigte sich die geringste Zunahme für die höchste Konzentration NHDF. Diese Entwicklung deckt sich mit den Beobachtungen auf den Mikroskopieaufnahmen. Hier zeigte sich schon in der Lebend-Tot-Färbung eine gut erkennbare Zunahme der Zellzahlen für die beiden niedrigeren Konzentrationen, während für die Konzentration von $1,2 \times 10^6$ Zellen/ml die Bildung von Zell-Zell-Kontakten beobachtet werden konnte. Die in Abbildung 42D dargestellten Fluoreszenzen für GelMA High zeigen ebenfalls eine Zunahme der Fluoreszenz über die Kultivierungsdauer von 21 Tagen. Die stärkste Zunahme auf 347 % des Startwertes wurde für die niedrigste Zellkonzentration

detektiert. Die Lebend-Tot-Färbung zeigte für GelMA *High*, dass NHDF in den drei eingesetzten Konzentrationen über 21 Tage kultiviert werden können. Dies wurde durch den PrestoBlue Assay bestätigt. Die beste Proliferation zeigten die NHDF somit in den Hydrogelen GelMA8.0 und GelMA *High* in der niedrigsten Zellkonzentration.

3.4.3.2 GeINB/GelS

Zur Beurteilung der Proliferation von NHDF in GeINB/GelS wurde ebenfalls der PrestoBlue Assay analog zur Durchführung von GelMA durchgeführt. Die gemessenen Fluoreszenzen sind in Abbildung 43 dargestellt.

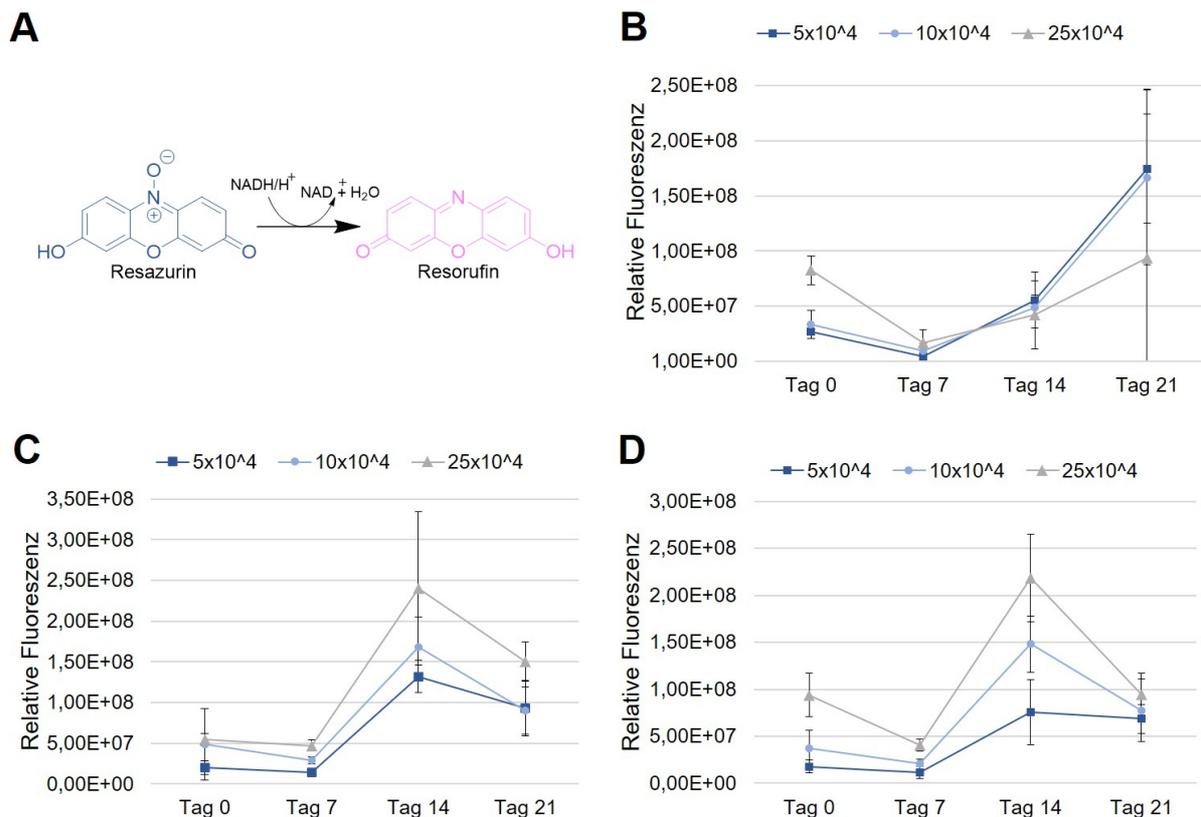


Abbildung 43: PrestoBlue Assay zur Untersuchung der Proliferation von primären Fibroblasten in GeINB/GelS Gelen. (A) Reduktion von Resazurin durch metabolisch aktive Zellen zum fluoreszierenden Farbstoff Resorufin. (B) Proliferation von NHDF in GeINB/GelS Low. (C) Proliferation von NHDF in GeINB/GelS Medium. (D) Proliferation von NHDF in GeINB/GelS High. Angegeben ist die Zellzahl für in 200 µl GelMA eingekapselte NHDF. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten, die Berechnung des Mittelwertes mit n=3, die der Standardabweichung mit n-1.

In den GeINB/GelS *Low* Gelen zeigte sich eine Zunahme der Fluoreszenz von Tag 0 bis Tag 21. Für die Konzentration von 0,25x10⁶ Zellen/ml stieg die Fluoreszenz auf 1189 % gegenüber Tag 0. Die Zunahme der Fluoreszenz sank mit der Zunahme der Anzahl eingebetteter NHDF auf 503 % beziehungsweise 112 %. Der PrestoBlue Assay bestätigte damit, dass die drei Zellkonzentrationen in GeINB/GelS *Low* über 21 Tage erfolgreich kultiviert werden konnten. Gegenüber der Zunahme von 184 % für 2,5x10⁶ Zellen/ml wirkte sich die Reduktion der Zellzahl positiv aus.¹³⁰ Auch in GeINB/GelS *Medium* zeigte die kleinste

Zellkonzentration die größte Zunahme der Fluoreszenz auf 469 % des Startwertes. Mit Zunahme der Konzentration sank auch in diesem Gel die Zunahme der Fluoreszenz. Dennoch führte die Reduzierung der Zellzahl zu einer größeren Zunahme der Fluoreszenz, als in GelNB/GelS Hydrogelen mit $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml. S. Haase ermittelte hier lediglich eine Zunahme von 11 %. In GelNB/GelS *High* eingekapselte NHDF zeigten ebenfalls in den niedrigeren Konzentrationen die höheren Zunahmen der Fluoreszenz auf 387 % beziehungsweise 210 % der Fluoreszenz von Tag 0.

Aus der Zunahme der Fluoreszenzen im PrestoBlue Assay ging hervor, dass GelNB/GelS eine stärkere Proliferation der NHDF in den unterschiedlichen Konzentrationen ermöglicht als GelMA, lediglich für die *High* Varianten unterschied sich die Zunahme kaum, eine eindeutige Aussage, welche Zellzahl besonders geeignet ist konnte nicht getroffen werden. Es wurde deutlich, dass der Einsatz von unterschiedlichen Zellkonzentrationen an den angestrebten Zweck des Experimentes angepasst werden muss. Abhängig von dem Fokus des jeweiligen Experimentes, muss entschieden werden, ob höhere oder niedrigere Zellzahlen verwendet werden.

3.4.4 Kultivierung länger als 21 Tage

Der Aufbau von Gewebemodellen ist komplex und erfordert oft mehrere nacheinander ausgeführte Schritte. Insbesondere der Aufbau von Geweben aus unterschiedlichen Zelltypen und verschiedenen Materialien erfordert ausreichende Adaptionszeiten für die enthaltenen Zellen.¹⁹⁸ Da Gewebemodelle der Untersuchung von Krankheiten und Wirkstoffen dienen sollen und im Hinblick auf die regenerative Medizin eine lange Lebensdauer eines Implantates gegeben sein muss, müssen sich die Zellen in den verwendeten Stützmaterialien ohne Verlust der Viabilität und Stabilität lange Zeit kultivieren lassen. Um dies für die Hydrogele GelMA und GelNB/GelS zu überprüfen wurden humane Hautfibroblasten eingebettet und für bis zu 35 Tage kultiviert. Da sich aus der Reduzierung der Zellzahl keine offensichtlichen Vorteile, hinsichtlich Proliferation und Bildung von Zell-Zell-Kontakten ergaben, wurde mit $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml gearbeitet. Auf eine absichtliche Verlängerung der Lebensdauer durch Reduzierung der Zellzahl wurde bewusst verzichtet, um zu sehen, wie lange die Gele mit der maximalen Zellkonzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml stabil sind und ob die Abnahme der Viabilität ab Tag 14 durch einen Nährstoffmangel verursacht wurde. Die Ergebnisse der Lebend-Tot-Färbung für den Zeitraum Tag 0 bis Tag 21 wurden bereits von Sonja Haase veröffentlicht.¹³⁰ Da sich für GelMA1.0 und GelNB/GelS *Low* eine Abnahme der Viabilität ab Tag 14 zeigte, wurden die vernetzten zellbeladenen Hydrogele an Tag 0 aus der Gussform in eine 24-Well Platte überführt, um den Zellen mehr Kultivierungsmedium und damit Nährstoffe zur Verfügung zu stellen und somit einem Nährstoffmangel als Ursache für abnehmende Viabilitäten vorzubeugen (Abbildung 44).

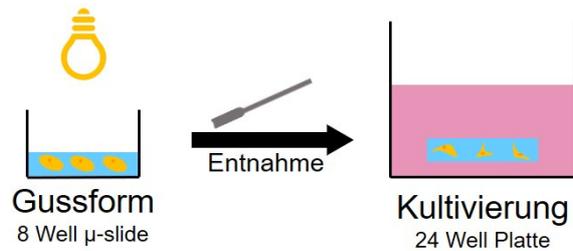


Abbildung 44: Kultivierung von in Hydrogelen eingebetteten NHDF über 35 Tage. Die NHDF wurden in einem ibidi 8-well µ-slide in das jeweilige Hydrogel eingekapselt und das vernetzte Hydrogel anschließend in eine 24-Well Platte überführt, um mehr Medium zur Verfügung stellen zu können.

An Tag 28 und 35 wurde eine Lebend-Tot-Färbung der NHDF mit Calcein-AM (4 µM) und PI (0,02 mg/ml) durchgeführt und mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5) visualisiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 45 gezeigt.

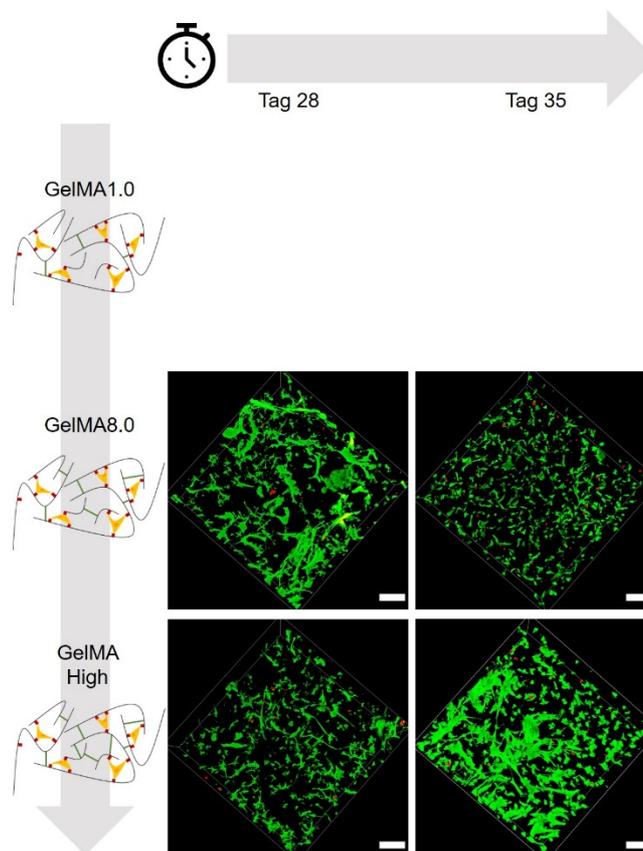


Abbildung 45: Lebend-Tot-Färbung von NHDF ($2,5 \times 10^6$ NHDF/ml, 5 % GelMA mit 0,3 % LAP) in GelMA an Tag 28 und 35. Die Auswertung erfolgte mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5, 10x Objektiv, Zoom 1,5, grün Ex. 494 nm, Em. 499-544 nm; rot Ex. 549 nm, Em. 591-725 nm). Es wurden Z-Stacks mit einer Höhe von 300 µm aufgezeichnet (Schrittgröße 5 µm) und mit der Software Leica LasX 3D rekonstruiert. Maßstab 200 µm.

Eine Kultivierung für längere Zeiträume als 21 Tage war für GelMA1.0 nicht möglich. Die Abnahme der Viabilitäten konnte nicht durch die Zugabe von mehr Medium verhindert werden, die hohe Proliferation führte dazu, dass die Zellen das Gel abgebaut haben und an Tag 28 und Tag 35 keine 3D Strukturen mehr zu detektieren waren. Für die stärker vernetzten Gele GelMA8.0 und GelMA High war eine Kultivierung für 28 und 35 Tage möglich. Für beide Gele wurde eine starke Elongation der NHDF detektiert. Bis Tag 21 war diese noch deutlich

geringer.¹³⁰ Somit eignen sich die Gele GelMA8.0 und GelMA *High* für die Kultivierung von eingekapselten NHDF für lange Zeiträume, wodurch auch in diesen Gelen eine starke Elongation und die Bildung von Zell-Zell-Kontakten erreicht werden kann. Die in Abbildung 32 gezeigten Tiefenfärbungen der GelMA Gele bestätigten die noch vorhandene 3D Struktur nach 38 und 35 Tagen.

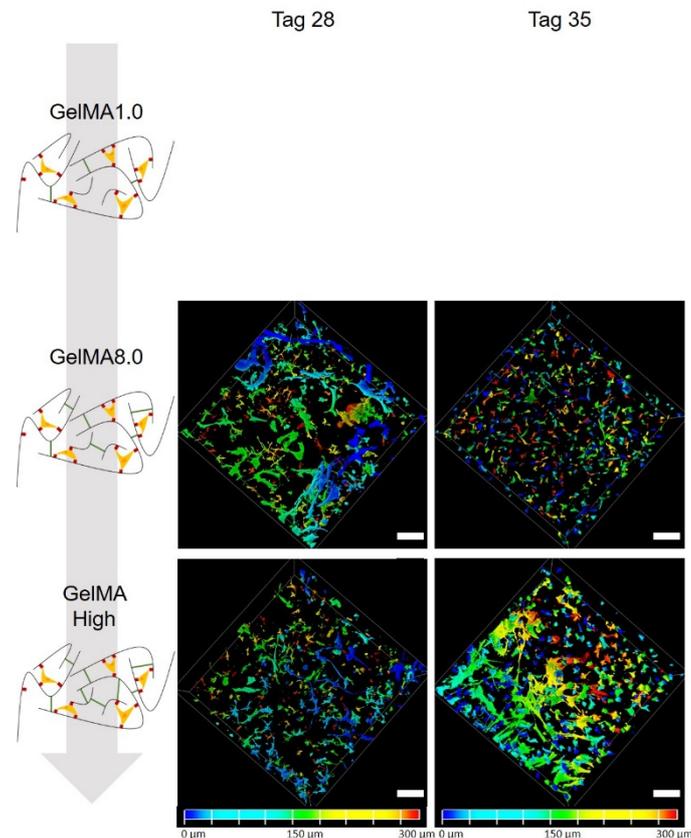


Abbildung 46: Tiefenfärbung der eingekapselten NHDF ($2,5 \times 10^6$ NHDF/ml, 5 % GelMA mit 0,3 % LAP) in GelMA an Tag 28 und Tag 35. Die Auswertung erfolgte mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5, 10x Objektiv, Zoom 1,5, grün Ex. 494 nm, Em. 499-544 nm; rot Ex. 549 nm, Em. 591-725 nm). Es wurden Z-Stacks mit einer Höhe von 300 μm aufgezeichnet (Schrittgröße 5 μm). Die Erstellung der 3D-Rekonstruktion der Z-Stack und die Tiefenfärbung erfolgten mit der Software Leica LasX. Maßstab 200 μm .

Für das Hydrogel GelNB/GelS wurde das Einkapseln von NHDF für lange Zeiträume analog zu GelMA durchgeführt. Besonders für GelNB/GelS *Low* nahm die Viabilität ab Tag 14 ab.¹³⁰ Da sich durch das Überführen in eine 24-Well Platte eine verbesserte Nährstoffzufuhr gegenüber der von Sonja Haase angewandten Methode bestand, konnte bestätigt werden, dass die Abnahme der Viabilität nicht auf einen Nährstoffmangel, sondern vielmehr auf die zunehmende Instabilität der Gele, zurückzuführen war.¹³⁰ Eine Kultivierung über 28 und 35 Tage war möglich, es zeigten sich jedoch auch hier bei starker Ausrichtung der NHDF und starker Bildung von Zell-Zell-Kontakten abnehmende Viabilitäten. Ebenso ist in Abbildung 33 zu erkennen, dass die GelNB/GelS *Low* Gele keine gleichmäßige Struktur mehr aufwiesen. Gegenüber GelMA1.0 zeigte sich der Vorteil, dass eine Kultivierung möglich war.

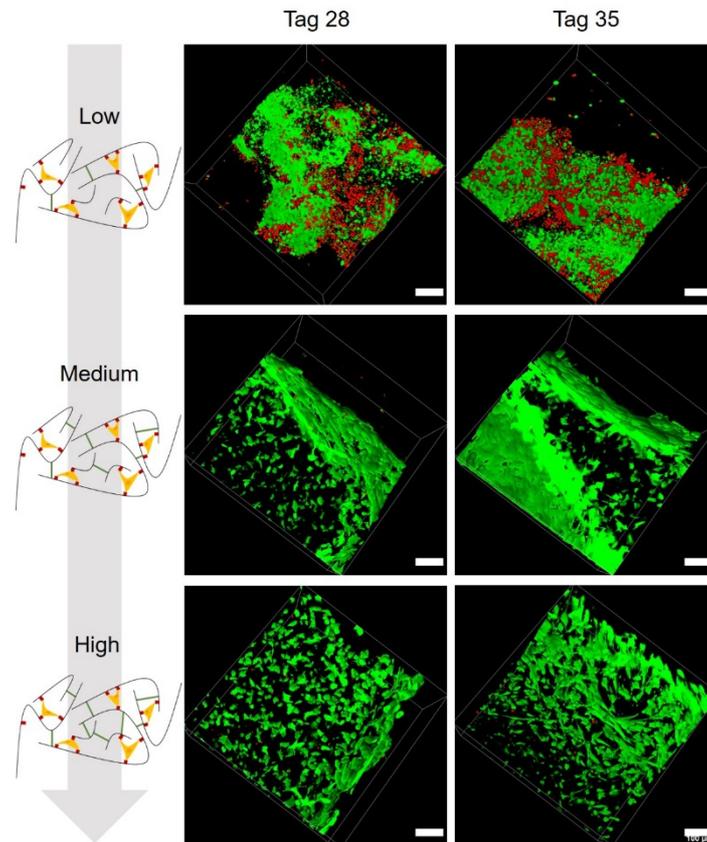


Abbildung 47: Lebend-Tot-Färbung von NHDF ($2,5 \times 10^6$ NHDF/ml, 5 % GelINB/GelS mit 0,03 % LAP) in GelINB/GelS an Tag 28 und 35. Die Auswertung erfolgte mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5, 10x Objektiv, Zoom 1,5, grün Ex. 494 nm, Em. 499-544 nm; rot Ex. 549 nm, Em. 591-725 nm). Es wurden Z-Stacks mit einer Höhe von $300 \mu\text{m}$ aufgezeichnet (Schrittgröße $5 \mu\text{m}$) und mit der Software Leica LasX 3D rekonstruiert. Maßstab $200 \mu\text{m}$.

Für GelINB/GelS *Medium* zeigte sich an Tag 28 eine starke Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten. Besonders an den Rändern der Gele bildeten die NHDF dichte Strukturen, die sich bis Tag 35 noch verstärkten und das ganze Gel durchzogen. Die in GelINB/GelS *High* eingebetteten NHDF zeigten ein ähnliches Verhalten, es war jedoch ein geringeres Vorkommen von Zell-Zell-Kontakten vorhanden. Im Vergleich zu GelMA richten sich die NHDF auch nach langen Zeiträumen in GelINB/GelS stärker aus und bildeten vermehrt Zell-Zell-Kontakte. Dies zeigte erneut die höhere Biokompatibilität von GelINB/GelS gegenüber GelMA.¹⁵⁴ In Abbildung 34 sind die für in GelINB/GelS eingekapselten NHDF angefertigten Tiefenfärbungen an Tag 28 und 35 gezeigt.

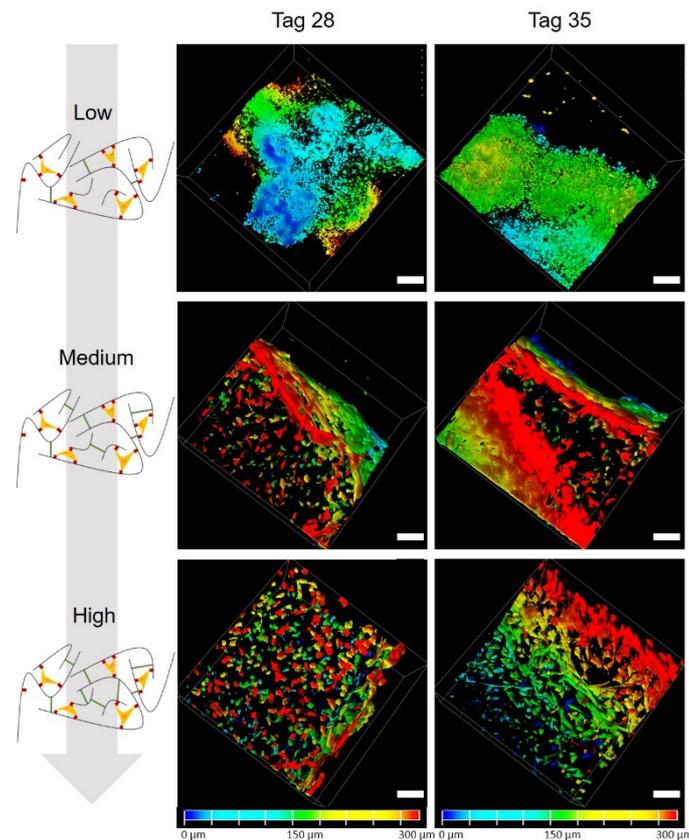


Abbildung 48: Tiefenfärbung der eingekapselten NHDF ($2,5 \times 10^6$ NHDF/ml, 5 % GeINB/GelS mit 0,03 % LAP) in GeINB/GelS an Tag 28 und Tag 35. Die Auswertung erfolgte mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5, 10x Objektiv, Zoom 1,5, grün Ex. 494 nm, Em. 499-544 nm; rot Ex. 549 nm, Em. 591-725 nm). Es wurden Z-Stacks mit einer Höhe von 300 µm aufgezeichnet (Schrittgröße 5 µm). Die Erstellung der 3D-Rekonstruktion der Z-Stack und die Tiefenfärbungen erfolgten mit der Software Leica LasX. Maßstab 200 µm.

In GeINB/GelS Low durchzogen die NHDF an Tag 28 das Gel stellenweise noch über 300 µm. An Tag 35 war die 3D Struktur jedoch deutlich vermindert, die ausgerichteten NHDF durchzogen die Gele nur noch über 150 µm. Für GeINB/GelS Medium und High waren sowohl an Tag 28 als auch an Tag 35 vollständige 3D Strukturen über eine Höhe von 300 µm zu erkennen. Die Tiefenfärbungen bestätigten auch für GeINB/GelS das Vorliegen von vollständigen 3D Strukturen nur für die Medium und High Variante.

Die Kultivierung über lange Zeiträume ermöglichte die Bildung von Zell-Zell-Kontakten und Elongation der NHDF auch in den festeren Gelen GeIMA8.0/High und GeINB/GelS Medium/High. Insgesamt zeigte sich jedoch in GeINB/GelS die stärkere Ausrichtung und vermehrte Zell-Zell-Kontakte. Für GeINB/GelS Low war eine Kultivierung im Gegensatz zu GeIMA1.0 zwar möglich, jedoch nur in unvollständiger 3D Verteilung. Da GeIMA1.0 und GeINB/GelS Low weniger stark vernetzt sind, könnte der Grund für die schnelle Ausrichtung und Netzwerkbildung der NHDF hierin liegen. Die schwächere Vernetzung könnte auch den schnelleren Abbau erklären, da weniger Bindungen gespalten werden müssen. Durch Verlängerung der Kultivierungszeit konnte es den NHDF ermöglicht werden, auch die festeren Gele um- und abzubauen und sich auch in diesen auszurichten, zu migrieren und Zell-Zell-

Kontakte zu bilden. Die höhere Stabilität und dichtere Vernetzung könnte der Grund sein, dass dieser Vorgang länger dauert als in den weichen Gelen.^{130,199,200} Somit konnte noch einmal bestätigt werden, dass beide Hydrogele für die Langzeitkultivierung geeignet sind, sich jedoch in GelNB/GelS eine stärkere Ausrichtung und Netzwerkbildung zeigte als in GelMA.

3.4.5 NHDF in großen Strukturen

Im Hinblick auf den Einsatz der Gele als Biotinten im 3D Biodruck, ist es von besonderer Bedeutung, dass auch größere Strukturen durchgängig ausreichend mit Nährstoffen und Gasen durchdrungen werden können. Um dies zu beurteilen, wurden Würfel aus den Hydrogelen angefertigt und hinsichtlich Diffusion in den Kern und Versorgung von Zellen im Kern untersucht. Das Vorgehen ist schematisch in Abbildung 49A gezeigt.

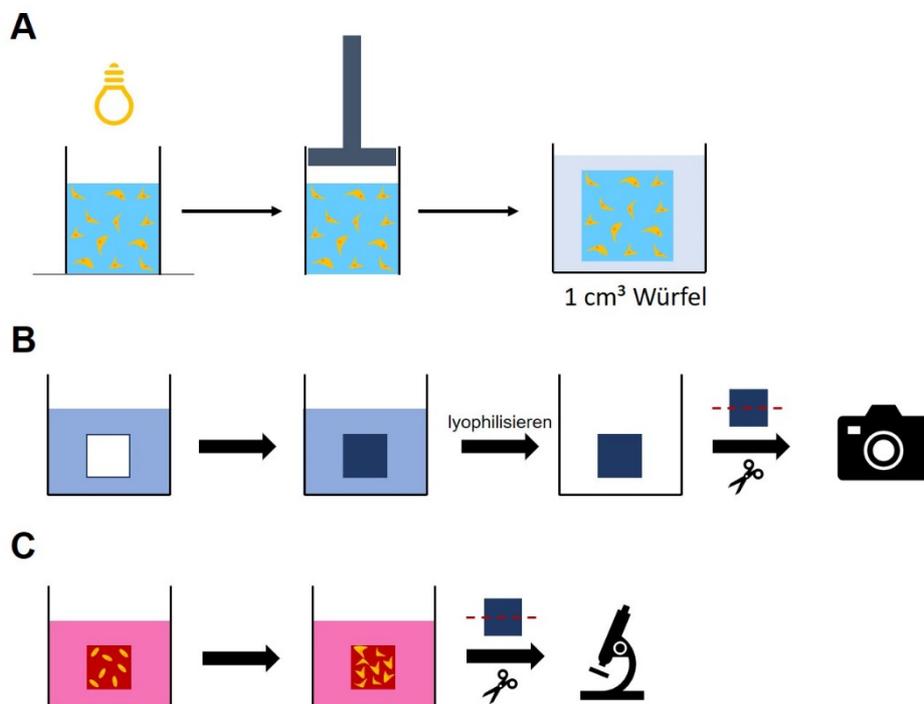


Abbildung 49: Vorgehen zur Untersuchung der Eignung von GelMA und GelNB/GelS für den Aufbau von großen Strukturen hinsichtlich der Durchdringbarkeit für kleine Moleküle und der Versorgung von Zellen. (A) 1 ml der Photopolymerlösung wurden in einer Gussform polymerisiert und anschließend mit Hilfe eines Stempels entnommen. Die Herstellung erfolgte analog für Gele mit und ohne NHDF. (B) Analyse der Diffusion von kleinen Molekülen in die Würfel. (C) Untersuchung der Viabilität von eingebetteten Zellen im Kern der Würfel.

In einer Gussform wurde je 1 ml Photopolymerlösung (5 % GelMA, 0,3 % LAP/5 % GelNB/GelS, 0,03 % LAP) mit dem Omnicure S2000 polymerisiert. Nach der Entnahme der Würfel aus der Gussform wurden diese zur Beobachtung der Diffusion kleiner Moleküle in eine Methyleneblaulösung (24,9 mM) eingelegt (Abbildung 49B). Die Konzentration der Methyleneblaulösung entsprach der Konzentration von Glucose in DMEM. Nach unterschiedlichen Zeiten (10 Min, 20 Min, 40 Min, 60 Min, 90 Min, 2 Stunden, 3 Stunden, 4 Stunden) wurden die Würfel aus der Lösung entnommen, vorsichtig von überschüssiger Flüssigkeit befreit und sofort bei -20 °C eingefroren. Zur Beurteilung des Inneren der Würfel

wurden diese nach dem Einfrieren lyophilisiert und die trockenen Würfel mit einem Skalpell halbiert. Die Dokumentation der Schnittflächen erfolgte fotografisch. Die Aufnahmen der Schnittkanten sind in Abbildung 50 gezeigt.

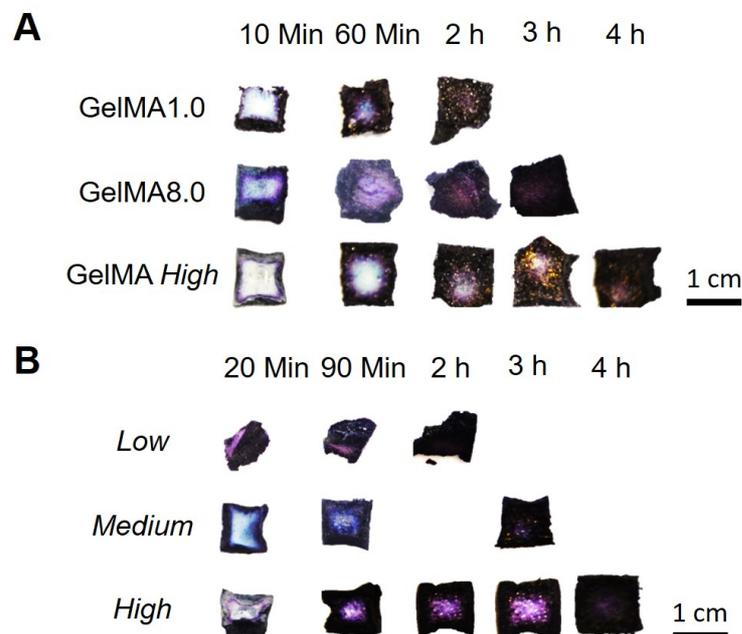


Abbildung 50: Schnittflächen der in Methylenblaulösung eingelegt Würfel aus Hydrogelen. Je 1 ml Photopolymerlösung wurde in einer Form polymerisiert und der erhalten Würfel in Methylenblau (24,9 mM) eingelegt. Nach Entnahme der Würfel wurden diese lyophilisiert, aufgeschnitten und die Schnittkanten fotografisch dokumentiert. (A) GelMA, (B) GelNB/GelS.

Eine vollständige blaue Färbung der Schnittfläche diente als Maß für die vollständige Durchdringung des Würfels. Eine vollständige Färbung des Kernes für GelMA1.0 konnte nach 120 min festgestellt werden, für GelMA8.0 nach 180 min und für GelMA High nach 240 min. Eine Erklärung hierfür ist der unterschiedliche Funktionalisierungsgrad der Photopolymere. Je höher der Funktionalisierungsgrad, umso dichter vernetzt sind die Hydrogele. Eine dichte Vernetzung sorgt gleichzeitig für kleinere Poren und damit eine schlechtere Diffusion.^{201,202} Die vollständige Färbung der Schnittflächen der GelNB/GelS Würfel, wurde nach den gleichen Zeiten erreicht. Da die Funktionalisierungsgrade der Photopolymere jeweils denen von GelMA ähnelten, war eine ähnlich starke Vernetzung vorhanden und das Ergebnis der gleichen Durchdringbarkeit somit zu erwarten.²⁰¹ Neben der Durchdringbarkeit für Nährstoffe spielt die Diffusion von Abbauprodukten und Zellmüll zusätzlich eine Rolle und muss gewährleistet sein. Dies scheint durch die vollständige blaue Färbung nach kurzer Zeit gegeben zu sein. Um zu beurteilen, ob dieser Zeitraum ausreichend kurz ist, um Zellen im Kern einer solchen Struktur zu versorgen, wurden NHDF in Würfel aus GelMA1.0 und GelNB/GelS Low eingebettet. Die Herstellung der Würfel erfolgte analog zur Herstellung der Würfel ohne Zellen, jedoch unter sterilen Bedingungen. Nach der Entnahme der Würfel aus der Gussform wurden diese in eine 24-Well Platte gegeben und mit DMEM (10 % FCS, 1 % P/S) umgeben. Direkt nach der Einbettung und nach 7 Tagen wurde eine Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM (4 μ M) und PI

(0,02 mg/ml) durchgeführt. Für die Lebend-Tot-Färbung wurden die Würfel aus dem DMEM entnommen, mit einem Skalpell halbiert und die Hälften in ein ibidi 8-Well μ -slide überführt (Abbildung 49C). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schnittfläche nach unten zeigte. Die Ergebnisse der Visualisierung mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica TCS SPE, Leica Stellaris 5) sind in Abbildung 51 gezeigt.

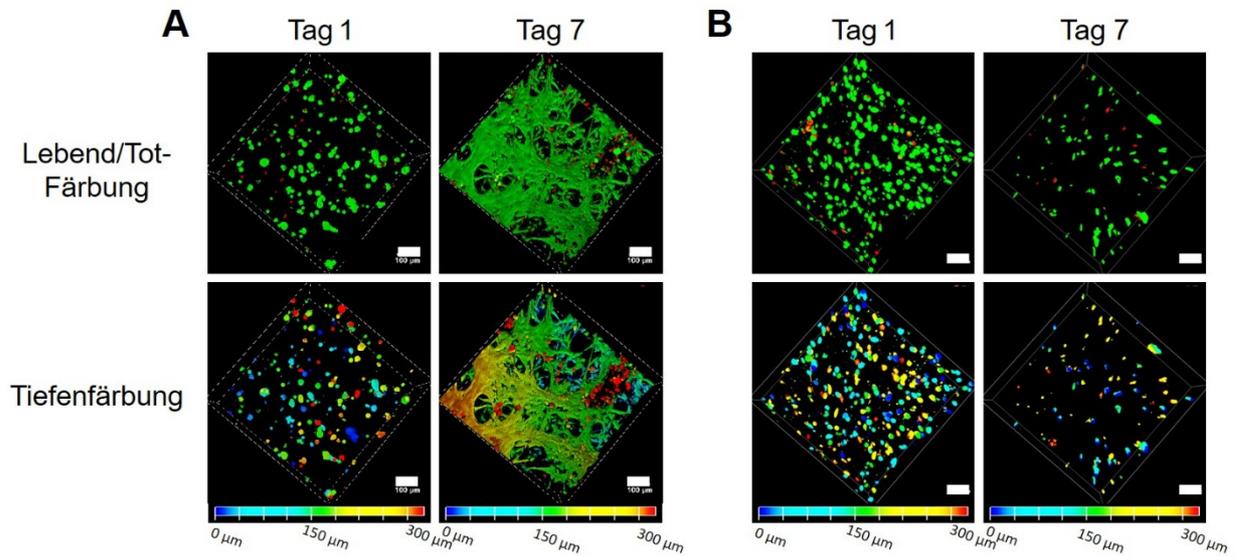


Abbildung 51: Lebend-Tot-Färbung und zugehörige Tiefenfärbung von in 1 cm^2 Würfeln eingebetteten NHDF an Tag 0 und Tag 7. Die Färbung der Schnittfläche erfolgte mit Calcein-AM (grün) und PI (rot). Die Auswertung erfolgte mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5, 10x Objektiv, Zoom 1,5, grün Ex. 494 nm, Em. 499-544 nm; rot Ex. 549 nm, Em. 591-725 nm). Es wurden Z-Stacks mit einer Höhe von $300 \mu\text{m}$ aufgezeichnet (Schrittgröße $5 \mu\text{m}$). Die Erstellung der 3D-Rekonstruktion der Z-Stack und die Tiefenfärbung erfolgten mit der Software Leica LasX. (A) GelMA1.0, (B) GelNB/GelS Low. Maßstab $200 \mu\text{m}$.

Die in GelMA1.0 eingekapselten NHDF zeigten nach 7 Tagen eine hohe Viabilität und eine starke Elongation und viele Zell-Zell-Kontakte. In der Tiefenfärbung ist zu erkennen, dass die NHDF zu beiden Zeitpunkten gleichmäßig in allen Ebenen verteilt waren. Eine ähnlich hohe Viabilität zeigten die NHDF in den Würfeln aus GelNB/GelS Low, ebenso eine gleichmäßige Verteilung über alle Ebenen des Z-Stacks zu beiden Zeitpunkten. In GelNB/GelS Low war jedoch keine Elongation nach 7 Tagen zu erkennen. Während der Handhabung der Würfel war auffällig, dass die Würfel aus GelMA1.0 stabiler erschienen, als diese aus GelNB/GelS Low. Die Würfel aus GelNB/GelS Low haben während des Experimentes ihre Form verloren und waren vermutlich nicht stabil genug, um den NHDF eine Ausrichtung zu ermöglichen. Für beide Hydrogele konnte gezeigt werden, dass sie sich eignen, um große zellenthaltende Strukturen aufzubauen. Da die Photopolymerlösungen mit Zellsuspension in DMEM angesetzt wurden, ist die Versorgung der Zellen im Kern einer solchen Struktur durch DMEM gewährleistet, bis Nährstoffe aus dem umgebenden Medium den Kern erreichen. Somit können die mit Methylenblau bestimmten Zeiten bis zur Versorgung des Kerns als unproblematisch angesehen werden und die Hydrogele für den Aufbau von großen Strukturen verwendet werden. Dennoch muss beachtet werden, dass Zellen auch Proteine und Zucker

sekretieren können, die auf Grund ihrer Größe eine verminderte Diffusionsfähigkeit in den Gelen aufweisen können.²⁰²

3.4.6 Vergleich der Biokompatibilität von GelMA und GelNB/GelS

Die Hydrogele GelMA und GelNB/GelS wurde in den vorangehenden Kapiteln 3.4.1-3.4.5 auf ihre Biokompatibilität untersucht. Beide Hydrogele zeigten eine hohe Biokompatibilität. Durch den Vergleich der Ergebnisse wurde analysiert, ob GelNB/GelS gegenüber GelMA über eine erhöhte Biokompatibilität verfügte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Biokompatibilität von GelNB/GelS und GelMA. Die Ergebnisse der Kapitel 3.4.1-3.4.5 sind hier vereinfacht zusammengefasst. (+) gut, (++) sehr gut.

| | GelMA | GelNB/GelS |
|---|-------|------------|
| <i>Toxizität der Abbauprodukte</i> | + | ++ |
| <i>Viabilität NHDF</i> | + | ++ |
| <i>Proliferation NHDF</i> | + | ++ |
| <i>Kultivierung für lange Zeiträume</i> | + | ++ |
| <i>Versorgung von großen Strukturen</i> | + | + |

Die Abbauprodukte aller untersuchten Hydrogele zeigten keinen toxischen Effekt auf NHDF, es wurden jedoch im MTT-Assay die höhere Viabilitäten nach der Behandlung mit Abbauprodukten von GelNB/GelS erhalten. Um die Vergleichbarkeit der Biokompatibilität von GelMA und GelNB/GelS zu vereinfachen, wurde hier nur die Viabilität betrachtet. Bei dem qualitativen Vergleich der Viabilität der eingekapselten NHDF in Abbildung 36 bis Abbildung 41 zeigte sich ein besseres Abschneiden von GelNB/GelS im Vergleich zu GelMA. In GelNB/GelS wurden weniger nekrotische Zellen detektiert. Die Proliferation von NHDF in GelNB/GelS war im Vergleich zu den in GelMA eingekapselten NHDF erhöht. Im Gegensatz zu GelMA1.0 ließ sich GelNB/GelS Low über 35 Tage erfolgreich kultivieren, es fand eine starke Bildung von Zell-Zell-Kontakten statt. Zusätzlich konnte durch Verlängerung der Kultivierungsdauer in den Hydrogelen GelMA8.0 und *High*, sowie GelNB/GelS *Medium* und *High* die Elongation der NHDF sowie die Bildung von Zell-Zell-Kontakten erreicht werden, wobei sich in den GelNB/GelS Gelen eine stärkere Bildung von Zell-Zell-Kontakten zeigte. Die Kultivierung von NHDF in großen Strukturen war in beiden Systemen möglich. Insgesamt erwiesen sich die GelNB/GelS Hydrogele also als performanter als die GelMA Hydrogele. Die erhöhte Biokompatibilität von GelNB/GelS gegenüber GelMA konnte auch durch frühere Arbeiten bestätigt werden.^{130,154}

Nach der Analyse der Biokompatibilität wurden die Hydrogele als Biotinten im 3D Biodruck für den Aufbau eines Gewebemodells und die Entwicklung eines Druckprozesses für Hohlstrukturen angewandt.

3.5 3D Biodruck

Artifizielle Gewebe müssen reproduzierbar sein. Besonders im Hinblick auf den Einsatz in Wirkstoffanalysen und der regenerativen Medizin, müssen künstliche Gewebe in großer Zahl ohne Unterschiede in Zusammensetzung, Anordnung und Funktion aufgebaut werden. Um die Reproduzierbarkeit von Form und Anordnung zu gewährleisten, wurde in den letzten Jahren großer Aufwand in die Entwicklung und Evaluierung von Biodrucktechnologien investiert.^{6,18} Beim 3D Biodruck werden sogenannte Biotinten durch einen Druckprozess in eine bestimmte Form gebracht, um so die Umgebung der Zellen gewebegetreu zu simulieren.^{2,6} In verschiedenen Verfahren werden beim 3D Biodruck Strukturen spatio-temporal kontrolliert aufgebaut. So können 3D Strukturen mit einer definierten Anordnung von bestimmten Materialien und Zellen generiert werden. Gelatine-basierte Hydrogele eignen sich neben ihrer hohen Biokompatibilität auch wegen ihrer kontrollierbaren Viskosität für den Einsatz in unterschiedlichen 3D Biodrucktechnologien.^{23,101,124} Für den Aufbau von makro- und mikroskaligen Strukturen wird der extrusionsbasierte 3D Biodruck erfolgreich eingesetzt.²³ Besteht die Anforderung darin, nanoskalige Strukturen aufzubauen, so eignen sich Multiphotonen Lithografie-Methoden wie das *direct laser writing (DLW)*.⁷⁶ Für alle Technologien ist die Wahl eines geeigneten Materials von entscheidender Bedeutung für ein erfolgreiches Druckergebnis. Neben den biologischen Anforderungen muss das Material auch die Anforderungen des Druckprozesses erfüllen. Hydrogele haben sich hier als geeignet erwiesen, da sie eine ausreichende Formstabilität sowie eine hohe Biokompatibilität besitzen. Gelatine-basierte Hydrogele eignen sich für den Aufbau von gedruckten Strukturen mit unterschiedlichen Technologien besonders gut, da sich ihre Viskosität durch Temperatur beeinflussen lässt und so an den jeweiligen Druckvorgang angepasst werden kann.²⁵ Die einzelnen Helices der Gelatineketten lagern sich bei sinkenden Temperaturen zu Triplehelices zusammen und erhöhen so die Viskosität. Erwärmt man die Lösung, denaturiert die Tertiärstruktur und die Viskosität sinkt.¹²⁴ Dieser Vorgang der physikalischen Gelierung ist in Abbildung 52 gezeigt.

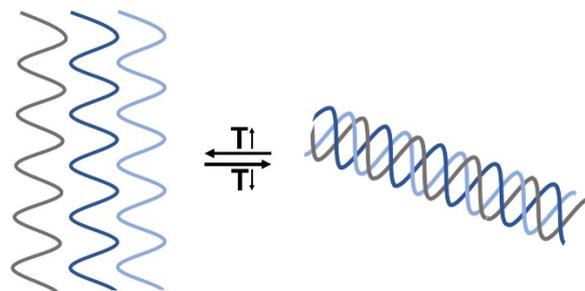


Abbildung 52: Darstellung des reversiblen Geliervorganges von Gelatine. Durch Abkühlen lagern sich die Helices zu Triplehelices zusammen, die Viskosität der Gelatinelösung steigt. Modifiziert nach Ahsan et al.²⁰³

Durch diesen Vorgang kann die Viskosität für den extrusionsbasierten 3D Biodruck erhöht werden, die gleiche Biotinte kann jedoch auch im *direct laser writing* eingesetzt werden, da durch Erwärmen eine ausreichend niedrige Viskosität erreicht wird.^{124,130}

3.5.1 Extrusionsbasierter 3D Biodruck

Beim extrusionsbasierten 3D Biodruck werden 3D Strukturen schichtweise aus viskosen Materialien aufgebaut. Die hohe Viskosität ist erforderlich, um eine ausreichende Formstabilität der Strukturen bis zur Polymerisierung mit Licht zu erreichen. Gleichzeitig muss gewährleistet sein, dass der auf die Zellen wirkende Scherstress während des Prozesses gering bleibt. Dies kann durch den Einsatz von scherverdünnenden Materialien erreicht werden. Diese Eigenschaft wurde für die eingesetzten Biotinten rheologisch charakterisiert. Um die Hydrogele GelMA und GeINB/GeIS später in extrusionsbasierten Druckprozessen einsetzen zu können, wurden zunächst die optimalen Druckparameter am Biodrucker bestimmt. Da sich die Viskosität von Gelatine durch Senken der Temperatur auf unter 24 °C erhöhen lässt, wurde zunächst die optimale Drucktemperatur bestimmt, bei der die Viskosität der Lösung hoch genug war, um eine Formstabilität der Struktur bis zur lichtinduzierten Polymerisierung zu erhalten. Es wurde die Temperatur gesucht, bei der ein durchgängiges Filament extrudiert werden konnte, das formstabil genug war um eine Gitterstruktur aufzubauen. Anschließend wurde die optimale Extrusionsgeschwindigkeit bestimmt, mit der eine hohe Auflösung erreicht werden konnte. Die Parameter wurden am BioSpot BP der Firma Biofluidix GmbH bestimmt und bildeten die Grundlage für die weiteren Experimente zum Aufbau eines Gewebemodells und von Hohlstrukturen. Nach dem Bestimmen der optimalen Druckparameter wurden diese angewendet, um Gitterstrukturen aus zellenthaltender Tinte aufzubauen. In Abbildung 53 ist das Vorgehen gezeigt.

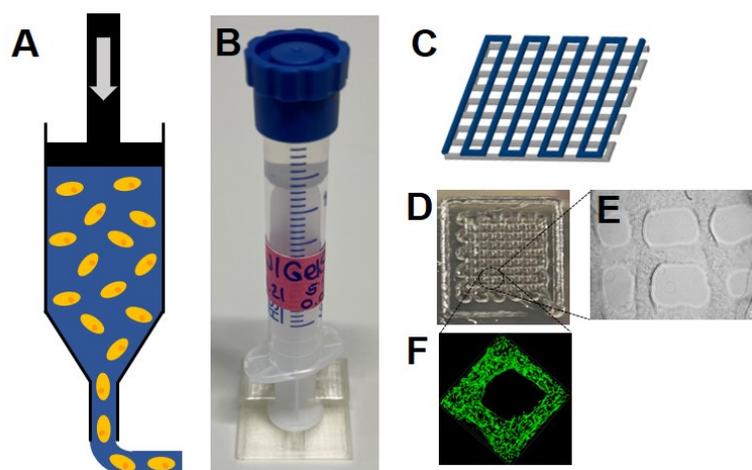


Abbildung 53: Darstellung des Vorgehens zur Ermittlung der optimalen Druckparameter und Überprüfung der Viabilität. (A) Extrusion einer Biotinte, (B) Lagerung der Tinte in der Spritze bei Raumtemperatur, (C) Bestimmung der optimalen Druckparameter, (D) 3D Modell der gedruckten Gitterstruktur, bestehend aus zwei Schichten, (E) gedruckte Gitterstruktur, (F) Hellfeldaufnahme eines gedruckten Gitters (G) Überprüfung der Viabilität von NHDF in gedruckten Strukturen

3.5.1.1 Scherviskosität und Fließgrenze von GelMA und GelNB/GelS

Um zu überprüfen, ob die vorliegenden Hydrogele für den extrusionsbasierten 3D Biodruck theoretisch geeignet sind, wurden diese rheologisch charakterisiert. Es konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden, dass die Photopolymerlösungen bei 14 °C ein viskoelastisches Festkörperverhalten zeigten.¹³⁰ Da die Lösungen durch eine Dosiernadel mit abnehmendem Innendurchmesser extrudiert werden, wurde rheologisch untersucht, ob die Lösungen ein scherverdünnendes Verhalten zeigen. Bei scherverdünnendem Verhalten nimmt die Viskosität einer Lösung mit zunehmender Scherrate ab.^{53,56} Bei Wegnahme der Scherkräfte erhöht sich die Viskosität wieder und die Formstabilität kehrt zurück. Durch Abnahme der Viskosität bei zunehmender Scherung wird der 3D Druck mit zellenthaltender Biotinte ermöglicht, da dadurch der auf die Zellen während des Druckvorganges wirkende Scherstress verringert wird.³⁷ In Abbildung 54A/C sind die erhaltenen Scherviskositäten gezeigt. Die Bestimmung erfolgte mit einem Platte-Platte Rheometer (HAAKE Rheoscope, Thermo Fisher Scientific, PP20 Messplatte, Messspalt 1mm) in einem Rotationsversuch über einen Scherratenbereich von 0,1-1000 s⁻¹. Die Viskosität der GelMA-Lösungen zeigte eine direkte Abhängigkeit von der Scherrate, sie sank von über 3000 Pa*s für 0,1 s⁻¹ auf unter 1 Pa*s für Scherraten über 400 s⁻¹. Eine Abhängigkeit vom Funktionalisierungsgrad konnte nicht detektiert werden. Für GelNB/GelS-Lösungen zeigte sich ebenfalls ein scherverdünnendes Verhalten. Die Viskosität sank mit zunehmender Scherrate von über 2000 Pa*s auf weniger als 1 Pa*s. Für Scherraten über 35 s⁻¹ zeigte sich eine Abhängigkeit der Scherviskosität vom Funktionalisierungsgrad. GelNB/GelS *Low* (6 Pa*s) zeigte in diesem Bereich eine höhere Scherviskosität als GelNB/GelS *Medium* (3 Pa*s) und *High* (1,5 Pa*s). Dies wird möglicherweise dadurch verursacht, dass die physikalische Gelierung durch die vorhandenen Norbornengruppen sterisch gehindert wird, die vorhandenen Thiolgruppen stören die Gelierung nicht. Die Plateau-Speichermodul für die Photopolymerlösungen, die in früheren Studien gemessen wurden, bestätigten dies. Der Plateau-Speichermodul von GelNB/GelS nahm mit zunehmender Funktionalisierung ab.¹³⁰

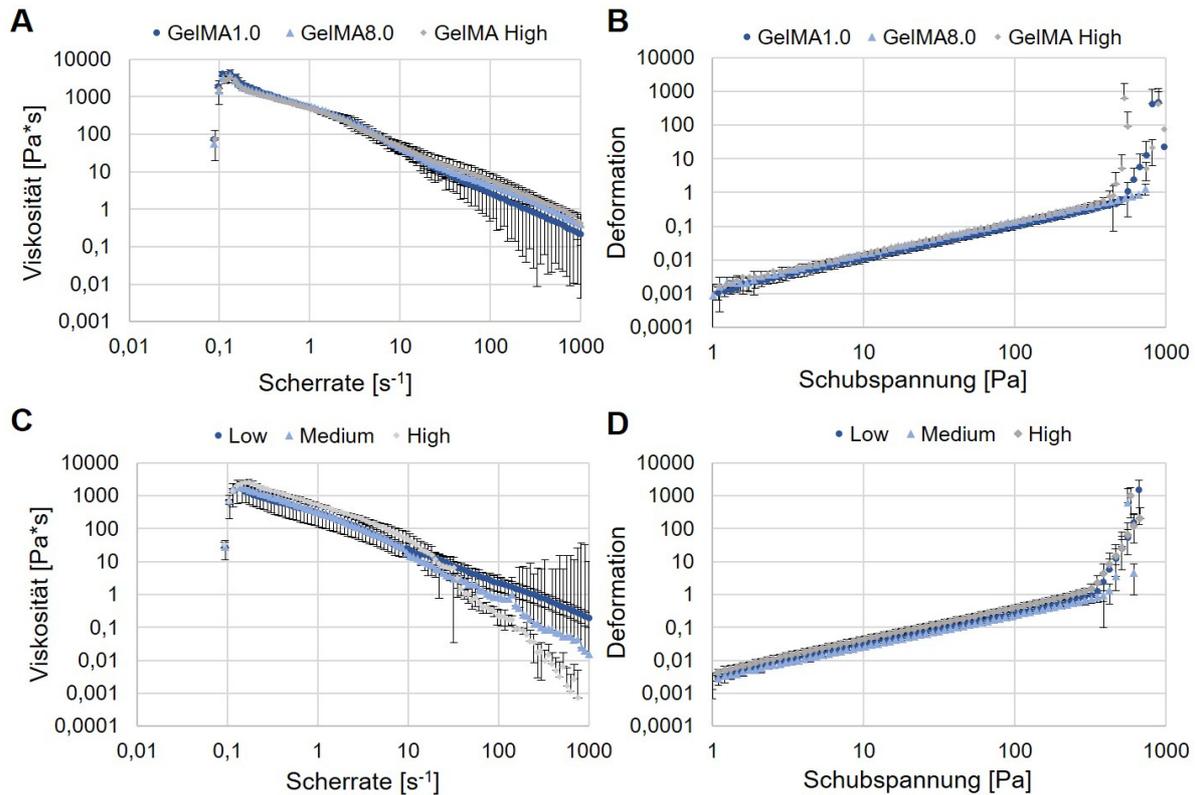


Abbildung 54: Viskosität und Deformationsprofile von GelMA und GelNB/GelS. Die 5 %-ige Photopolymerlösung wurde auf 14 °C gekühlt und die Scherviskosität, sowie das Deformationsprofil zur Bestimmung der Fließgrenze aufgezeichnet. (A) Scherviskosität von GelMA, (B) Deformationsprofil von GelMA, (C) Scherviskosität von GelNB/GelS, (D) Deformationsprofil von GelNB/GelS. In Zusammenarbeit mit Bruna Regina Maciel (Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik, KIT). Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten, die Berechnung des Mittelwertes mit $n=3$, die der Standardabweichung mit $n-1$.

Die Scherviskositäten bestätigten, dass die Photopolymerlösungen theoretisch für den 3D Biodruck geeignet sind. Neben der Scherviskosität wurden auch die Deformationsprofile der Lösungen bei 14 °C aufgezeichnet. Aus den Deformationsprofilen konnte die Fließgrenze bestimmt werden, die angibt, ab welcher mechanischen Spannung die elastische Verformung in ein Zerfließen übergeht. Für mechanische Spannungen oberhalb der Fließgrenze wird die Probe plastisch verformt, das heißt die Probe kehrt nicht mehr in ihre Ausgangsform zurück, sie zerfließt wie eine Flüssigkeit. In Abbildung 54B/D sind die Deformationsprofile für GelMA und GelNB/GelS Lösungen bei 14 °C gezeigt. Es konnte für keine der Lösungen eine klare Abhängigkeit der Fließgrenze vom Funktionalisierungsgrad erkannt werden. Für GelMA zeigte sich eine Abnahme der Fließgrenze von 740 Pa für GelMA1.0 auf 580 Pa für GelMA High. Für GelNB/GelS zeigte sich lediglich eine Abnahme von 468 Pa auf 365 Pa von Low zu High. Für GelNB/GelS wurde eine stärkere Abhängigkeit erwartet, da sich die Plateau-Speichermodul, und damit die Stabilität, der unterschiedlichen Funktionalisierungsgrade stark unterscheiden.¹³⁰ Eine Ursache hierfür konnte nicht ermittelt werden. Die mit der Tangentenmethode ermittelten Fließgrenzen sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 2: Fließgrenzen von GelMA.

| | <i>GelMA1.0</i> | <i>GelMA8.0</i> | <i>GelMA High</i> |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| <i>Fließgrenze [Pa]</i> | 740 ± 146 | 739 ± 92 | 580 ± 145 |

Tabelle 3: Fließgrenzen von GelNB/GelS.

| | <i>GelNB/GelS</i> | <i>GelNB/GelS</i> | <i>GelNB/GelS</i> |
|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | <i>Low</i> | <i>Medium</i> | <i>High</i> |
| <i>Fließgrenze [Pa]</i> | 468 ± 58 | 462 ± 76 | 365 ± 71 |

Da es sich bei der Zusammenlagerung der Gelatineketten um einen reversiblen Prozess handelt, werden die Triplehelices mit dem Erreichen der Fließgrenze zerstört. Die Renaturierung der Triplehelices kann jedoch durch erneutes Abkühlen der Lösung beziehungsweise konstante Kühlung erreicht werden. Um eine ausreichende Formstabilität zu gewährleisten, muss die Viskosität der zu verdruckenden Lösung hoch genug sein. Um dies zu erreichen, wurde sich die thermische Gelierung zu Nutze gemacht und zunächst die optimale Drucktemperatur bestimmt.

3.5.2 Bestimmung eines Richtwertes für die Drucktemperatur

Zur Bestimmung der zu verwendenden Drucktemperatur wurde die Biotinte (5 % GelMA / GelNB/GelS, 0,3 % / 0,03 % LAP) in eine 3 ml Spritze mit Luer-Lock Anschluss überführt und die verschlossene Spritze für 30 min über Kopf bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurde die Spritze in den Druckkopf des BioSpot BP eingesetzt und temperiert. Das Erreichen der erwünschten Temperatur wurde durch das Einbringen eines Thermometers durch den Konus der Spritze überprüft. Bei Erreichen der gewünschten Temperatur wurde eine Dosiernadel aufgesetzt und der Druckvorgang gestartet. Es wurde die Drucktemperatur für Dosiernadeln konischer Form und einem Innendurchmesser (ID) von 250 µm bestimmt. Es wurden verschiedene Temperaturen untersucht, diese sind Tabelle 22 (Kapitel 6.19.2) zu entnehmen. Als Extrusionsrate wurde eine beliebige gewählt, sodass eine gleichmäßige Extrusion stattfand. Es wurden Gitterstrukturen mit einer Kantenlänge von 12 mm gedruckt. Jede gedruckte Schicht wurde mit dem Omnicure S2000 zum Hydrogel vernetzt. Eine Temperatur galt als geeignet, wenn ein durchgängiges Gitter mit klar getrennten Linien erhalten wurde. Die erhaltenen Strukturen wurden fotografisch dokumentiert, für die Strukturen bei der geeigneten Drucktemperatur wurden Hellfeldaufnahmen mit dem Leica DMIL aufgenommen. Die gedruckten Strukturen für GelMA8.0 sind exemplarisch in Abbildung 55 gezeigt.

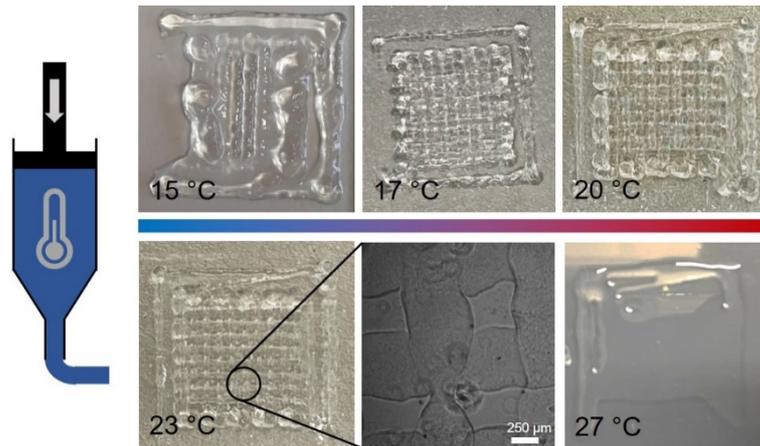


Abbildung 55: Gedruckte Gitterstrukturen aus GelMA8.0 (5 % GelMA, 0,3 % LAP). Zur Ermittlung der optimalen Drucktemperatur wurden verschiedene Temperaturen getestet (15 °C, 17 °C, 20 °C, 23 °C, 27 °C). Als geeignete Temperatur wurden 23 °C ermittelt. Dosiernadel ID 250 µm. Maßstab 250 µm.

Für GelMA8.0 wurde 23 °C als geeignete Temperatur ermittelt. Erwärmte man die Tinte weiter, begannen die Strukturen zu verlaufen. Bei Temperaturen unter 23 °C war die Tinte zu kalt, das Filament wurde nicht mehr gleichmäßig extrudiert, es bildeten sich Klumpen im Filament. Für eine Temperatur von 15 °C zeigte sich, dass zunächst aus der Dosiernadel Flüssigkeit gedrückt wurde, bevor das Hydrogel extrudiert wurde. Die Tinte lag bei dieser Temperatur nicht homogen vor und es konnte keine vollständige Gitterstruktur gedruckt werden. Bei langsamer Erhöhung der Temperatur konnten Gitter gedruckt werden, die jedoch keine homogenen Linien zeigten. Für eine Temperatur von 23 °C wurden Gitterstrukturen erhalten, die auch unter dem Mikroskop klar getrennte Linien aufwiesen. Die Temperaturverläufe von GelMA1.0 und GelMA High sind im Anhang gezeigt. Analog zum Vorgehen für GelMA wurden auch die Drucktemperaturen für GelNB/GelS ermittelt. Exemplarisch sind die erhaltenen Strukturen für GelNB/GelS *Medium* in Abbildung 56 gezeigt.

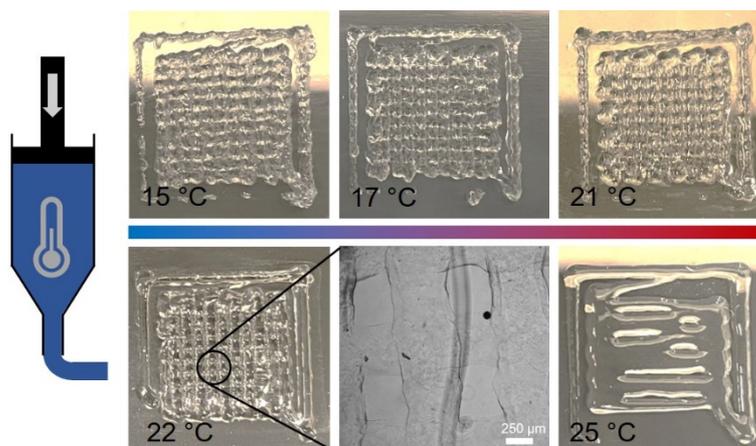


Abbildung 56: Gedruckte Gitterstrukturen aus GelNB/GelS (5 % GelNB/GelS, 0,03 % LAP). Zur Ermittlung der optimalen Drucktemperatur wurden verschiedene Temperaturen getestet (15 °C, 17 °C, 21 °C, 22 °C, 25 °C). Als geeignete Temperatur wurden 22 °C ermittelt. Dosiernadel ID 250 µm. Maßstab 250 µm.

Bei 27 °C konnte keine erkennbare Gitterstruktur gedruckt werden. Die einzelnen Linien sind ineinander verlaufen. Bei einer Drucktemperatur von 15 °C bis 21 °C konnten Gitter erhalten werden, jedoch ohne homogene Linien. Es war auch hier ein zunehmendes Verklumpen der Tinte mit Abnahme der Temperatur zu beobachten. Die Temperatur von 22 °C erwies sich als geeignete Temperatur, es wurde eine vollständige Gitterstruktur aus einem homogenen Filament erhalten. Die Linien waren auch unter dem Mikroskop klar getrennt. Die gedruckten Strukturen aus GeINB/GelS *Low* und *High* sind im Anhang 9.2.1 gezeigt. Für beide Hydrogele zeigte sich, dass zu hohe Temperaturen zu einer zu geringen Formstabilität führten, ebenso führten zu niedrige Temperaturen in beiden Fällen zu einer ungleichmäßigen Extrusion. Da sich mit sinkender Temperatur mehr Triplehelices zusammenlagern, musste die Temperatur gefunden werden, bei der genug Triplehelices vorlagen um eine ausreichende Formstabilität zu erreichen, die Tinte aber noch gleichmäßig extrudierbar war. Dies war für GelMA8.0 bei 23 °C und für GeINB/GelS *Medium* bei 22 °C der Fall. Somit konnten beide Tinten bei Temperaturen im Bereich der Raumtemperatur verdruckt werden, was den Druckprozess erheblich vereinfacht, da keine intensive Kühlung der Tinte nötig ist.

3.5.3 Bestimmung eines Richtwertes für die Extrusionsgeschwindigkeit

Bei dem genutzten Biodrucker BioSpot BP handelte es sich um einen Prototyp, der noch nicht für die Verarbeitung von photoreaktiven Hydrogelen getestet wurde. Er verfügte über einen Spritzenpumpen-basierten Extrusionsdruckkopf. Die Bewegung des Kolbens der Spritze, welche die Tinte enthielt, wurde durch eine Spritzenpumpe ausgeführt. Die Steuerung erfolgte über einen G-Code. Im verwendeten Modus konnte die Achsengeschwindigkeit und die Extrusionsgeschwindigkeit variiert werden. Nach Bestimmung der Drucktemperatur wurde durch systematisches Probieren die Achsengeschwindigkeit (F) bestimmt, bei der das Filament auch bei sehr geringen Extrusionsgeschwindigkeiten (E) nicht abbriss. Es handelte sich um die Geschwindigkeit, welche langsam genug war um genug Filament abzulegen, aber schnell genug um eine gleichmäßige Verteilung zu erhalten. Als optimale Achsengeschwindigkeit wurden 10 mm/s ermittelt. Mit der Achsengeschwindigkeit von 10 mm/s wurden weitere Gitterstrukturen gedruckt, die erneut schichtweise aufgebaut wurden. Jede Schicht wurde nach Beendigung mit dem Omnicure S2000 ausgehärtet. Die Vorbereitung der Tinte erfolgte analog zur Vorbereitung bei der Bestimmung der optimalen Drucktemperatur. Die Photopolymerlösung wurde in die Spritze überführt und im Druckkopf auf die ermittelte Drucktemperatur gebracht. Nach Erreichen der Temperatur wurden Gitterstrukturen gedruckt und dabei die Extrusionsgeschwindigkeit von 0,1 bis 0,01 mm/s variiert. Als optimale Extrusionsgeschwindigkeit wurde die Geschwindigkeit angesehen, die zu einer vollständigen Struktur mit möglichst schmalen Linien geführt hat. Exemplarisch sind in Abbildung 57 die Ergebnisse für GelMA8.0 dargestellt.

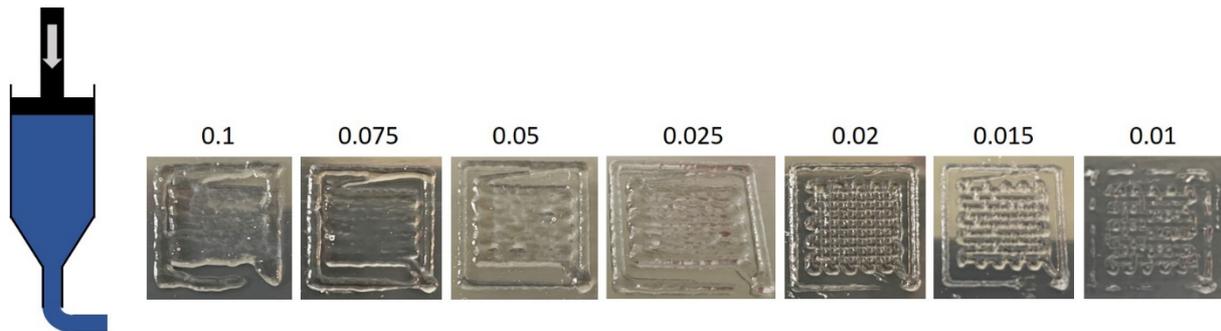


Abbildung 57: Gedruckte (Dosiernadel ID 250 μm) Gitterstrukturen aus 5 % GelMA8.0 mit 0,3 % LAP zur Bestimmung der optimalen Extrusionsgeschwindigkeit. Die Extrusionsgeschwindigkeit wurde von 0,1 mm/s bis 0,01 mm/s variiert. Als optimale Extrusionsgeschwindigkeit wurde 0,02 mm/s ermittelt.

Durch Verringerung von E konnten schmalere Filamentdurchmesser erreicht werden, die es ermöglichten klar definierte Gitterstrukturen zu drucken. Bei E von über 0,02 mm/s konnten keine getrennten Linien im Gitter erreicht werden (Linienabstand 1,2 mm). Durch Reduzierung der Extrusionsgeschwindigkeit reduzierte sich der Filamentdurchmesser und es lagen klar getrennte Linien vor. Als optimale Extrusionsgeschwindigkeit wurde 0,02 mm/s für GelMA8.0 ermittelt. Eine weitere Reduzierung führte zu Strukturen, die nicht mehr vollständig gedruckt wurden. Aus den bestimmten Druckparametern $E = 0,02 \text{ mm/s}$ und $F = 10 \text{ mm/s}$ konnte ein theoretischer Filamentdurchmesser von 0,44 mm berechnet werden (Anhang 9.2.3). Analog wurde die optimale Extrusionsgeschwindigkeit für eine Achsengeschwindigkeit von 10 mm/s für GelNB/GelS bestimmt. Die Ergebnisse für GelNB/GelS *Medium* sind in Abbildung 58 gezeigt.

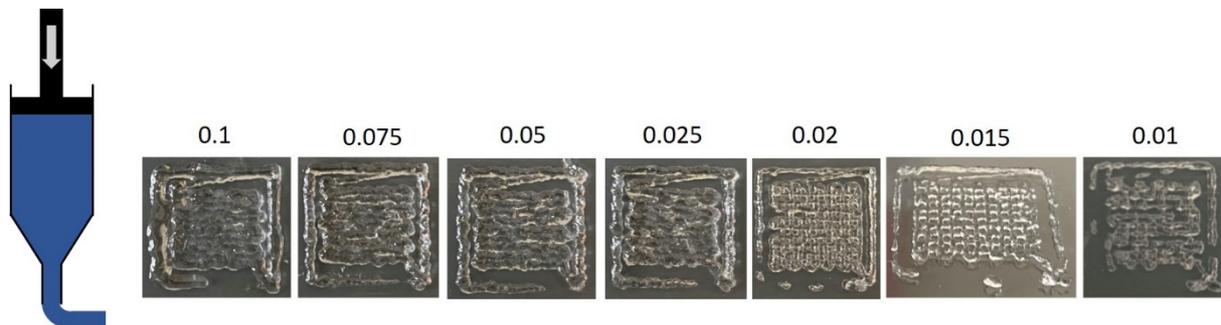


Abbildung 58: Gedruckte (Dosiernadel ID 250 μm) Gitterstrukturen aus 5 % GelNB/GelS *Medium* mit 0,03 % LAP zur Bestimmung der optimalen Extrusionsgeschwindigkeit. Die Extrusionsgeschwindigkeit wurde von 0,1 mm/s bis 0,01 mm/s variiert. Als optimale Extrusionsgeschwindigkeit wurde 0,015 mm/s ermittelt.

Für Extrusionsgeschwindigkeiten über 0,02 mm/s konnten keine klar getrennten Linien erhalten werden. Eine optimale Gitterstruktur wurde bei einer Extrusionsgeschwindigkeit von 0,015 mm/s erhalten, der berechnete Filamentdurchmesser lag für diese Parameter bei 0,38 mm. Eine weitere Reduzierung von E führte zu unvollständigen Gittern, weshalb 0,15 mm/s als optimale Extrusionsgeschwindigkeit festgelegt wurde. Da neben der Temperatur der Biotinte beim Druckvorgang auch die Luftfeuchtigkeit und Umgebungstemperatur den Vorgang beeinflussen können, konnten die ermittelten Parameter

nur als Richtwert gesehen werden. Die ermittelten Bedingungen sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Vor jedem Druckvorgang wurde ein Testdruck ausgeführt um die finalen Parameter festzulegen. Da die Extrusion Spritzenpumpen-basiert war, kann durch das Anpassen der Extrusionsgeschwindigkeit und/oder der Achsengeschwindigkeit der Filamentdurchmesser bei Verwendung der gleichen Dosiernadel verändert werden. Dadurch konnte für die Druckvorgänge eine konische Dosiernadel mit einem Innendurchmesser von 250 μm verwendet werden und die Parameter dennoch vor jedem Druckvorgang flexibel an die äußeren Gegebenheiten und das Material angepasst werden, um ein optimales Druckergebnis zu erhalten. So kann auch die Druckgeschwindigkeit je nach Anforderung reduziert werden, der Filamentdurchmesser bleibt durch Reduzieren von E jedoch gleich. Dies kann zum Beispiel für feingliedrige Strukturen nötig sein. Ein Verlangsamen der Achsengeschwindigkeit ermöglicht ein genaueres Ablegen des Filaments und damit eine höhere Präzision. Die gedruckten Strukturen für die Bestimmung der Drucktemperatur und E für GelMA1.0, GelMA *High*, GelNB/GelS *Low* und GelNB/GelS *High* sind im Anhang (Kapitel 9.2) gezeigt. Nach dem Festlegen von Richtwerten für die Druckparameter wurden Gitter aus zellenthaltenden Photopolymerlösungen gedruckt, um die Viabilität der enthaltenen Zellen nach dem Druckprozess zu untersuchen.

Tabelle 4: Ermittelte optimale Druckparameter für GelMA8.0 und GelNB/GelS *Medium* für eine konische Dosiernadel mit dem ID 250 μm und eine Achsengeschwindigkeit von 10 mm/s.

| | Temperatur [$^{\circ}\text{C}$] | E [mm/s] |
|------------------------------|-----------------------------------|----------|
| <i>GelMA8.0</i> | 23 | 0,02 |
| <i>GelNB/GelS Medium</i> | 22 | 0,015 |

3.5.4 Druck von Gitterstrukturen aus zellenthaltenden Hydrogelen

Zur Vorbereitung der zellenthaltenden Photopolymerlösungen wurden NHDF in Suspension gebracht und in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ NHDF/ml in die Photopolymerlösung gemischt. Die erhaltene Lösung wurde in eine 3 ml Spritze überführt und bei Raumtemperatur gelagert, um eine Gelierung zu erreichen. Die endgültige Temperierung erfolgte im Druckkopf auf die in Tabelle 4 gezeigten Temperaturen. Der Druck der Gitterstrukturen erfolgte mit einer konischen Dosiernadel mit einem ID von 250 μm . Die Extrusionsgeschwindigkeit wurde so angepasst, dass gleichmäßige Strukturen erhalten wurden (0,017-0,02 mm/s), jede Schicht wurde mit dem Omnicure S2000 polymerisiert. Nach dem Druckvorgang wurde der Objektträger aus dem Druckbett in eine Petrischale überführt und mit DPBS^{-/-} gewaschen. Das DPBS^{-/-} wurde abgenommen und die Struktur mit DMEM überschichtet. Zu den Zeitpunkten Tag 0, Tag 7 und Tag 14 wurde eine Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM (4 μM) und PI

(0,02 mg/ml) durchgeführt. Die Ergebnisse der Visualisierung mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5) sind in Abbildung 59 (GelMA) und Abbildung 60 (GelNB/GelS) gezeigt.

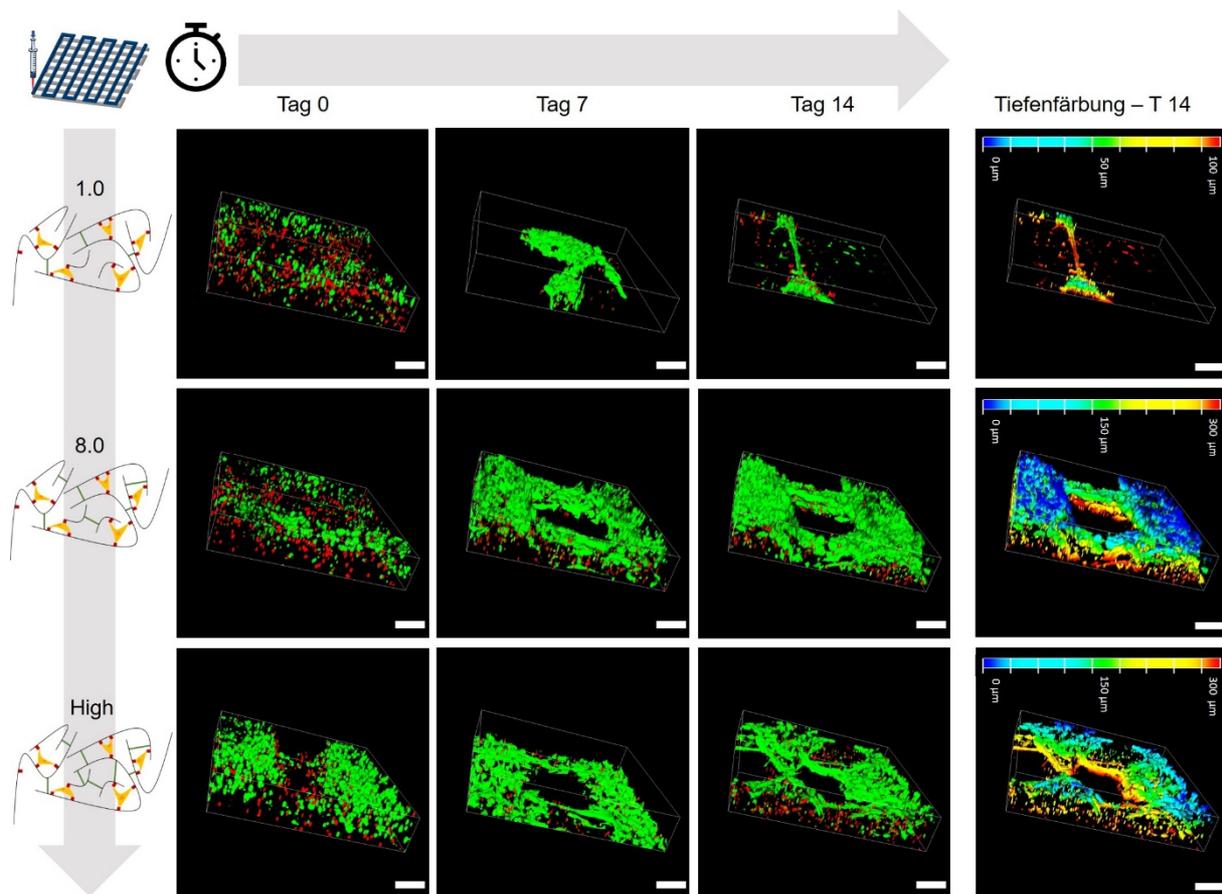


Abbildung 59: Lebend-Tot-Färbung von NHDF in gedruckten Gitterstrukturen aus GelMA. Die Färbung erfolgte an Tag 0, Tag 7 und Tag 14. Die Visualisierung erfolgte mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5, 10x Objektiv, Zoom 0,75, grün Ex. 494 nm, Em. 499-544 nm; rot Ex. 549 nm, Em. 591-725 nm). Es wurden Z-Stacks mit einer Höhe von 300 µm aufgezeichnet (Schrittgröße 5 µm), die Rekonstruktion erfolgte mit der Software Leica LasX. Die zugehörige Tiefenfärbung von Tag 14 ist rechts gezeigt. Maßstab 200 µm, Farbskala Tiefenfärbung rot 300 µm, blau 0 µm.

Die aus GelMA1.0 gedruckten Gitter, wiesen an allen Tagen viele grün fluoreszierende und damit lebende Zellen auf. Es war zu beobachten, dass die Struktur bereits an Tag 7 deutlich dezimiert vorlag und kein vollständiges Gitter mehr vorhanden war. Die in den Strukturen enthaltenen NHDF zeigten eine starke Elongation entlang der gedruckten Struktur. An Tag 14 konnte in den noch vorhandenen Stücken der gedruckten Struktur eine Verteilung der NHDF in allen Ebenen aufgezeichnet werden. In dem stabileren Gel GelMA8.0 war ebenfalls ein hoher Anteil lebender Zellen zu detektieren. Über den gesamten Kultivierungszeitraum konnte eine stabile Gitterstruktur kultiviert werden, die auch eine Elongation der Zellen entlang der Struktur zeigte. Die Tiefenfärbung an Tag 14 bestätigte die 3D Struktur, die in allen Ebenen NHDF zeigte. Für GelMA High zeigte sich das gleiche Verhalten. Wie schon bei den eingekapselten NHDF (Kapitel 3.4.2) zeigte sich, dass die Adhäsion und Elongation von NHDF in GelMA1.0 schneller stattfindet als in GelMA High bei hoher Viabilität. Auch im Hinblick auf

die Stabilität zeigten sich keine Unterschiede, GelMA1.0 wurde schneller von den NHDF abgebaut als GelMA8.0 und GelMA *High*. Neben der Viabilität nach dem Druckvorgang in GelMA wurde auch GelNB/GelS untersucht. Die Ergebnisse der Lebend-Tot-Färbung sind in Abbildung 60 gezeigt. Entlang der Struktur konnte eine starke Elongation der NHDF in allen GelNB/GelS Gelen detektiert werden. Ein Unterschied zwischen den Funktionalisierungsgraden war nicht erkennbar. Im Gegensatz zu GelMA zeigten sich keine Instabilitäten der Strukturen mit zunehmender Kultivierungsdauer. Die Tiefenfärbung zeigte eine 3D Verteilung der NHDF an Tag 14 in allen Strukturen.

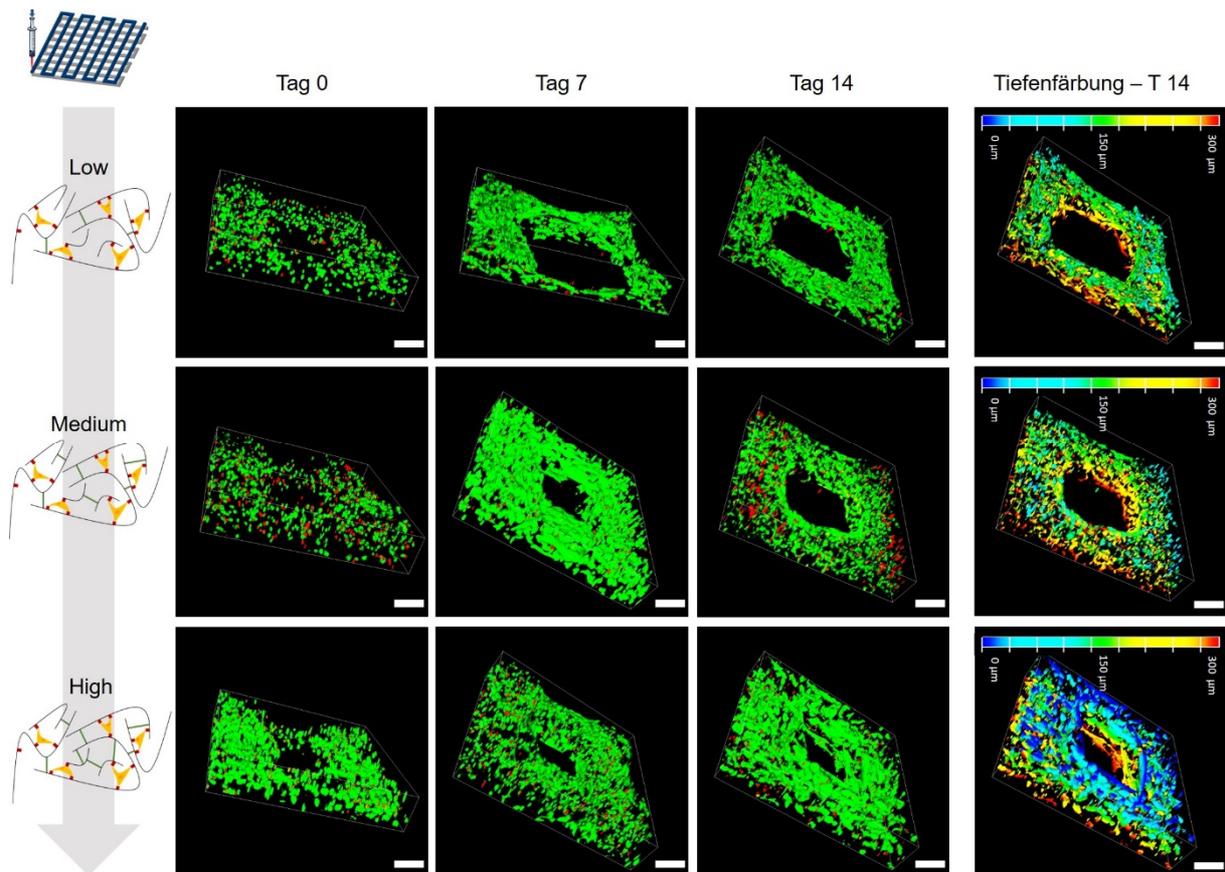


Abbildung 60: Lebend-Tot-Färbung von NHDF in gedruckten Gitterstrukturen aus GelNB/GelS. Die Färbung erfolgte an Tag 0, Tag 7 und Tag 14. Die Visualisierung erfolgte mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5, 10x Objektiv, Zoom 0,75, grün Ex. 494 nm, Em. 499-544 nm; rot Ex. 549 nm, Em. 591-725 nm). Es wurden Z-Stacks mit einer Höhe von 300 µm aufgezeichnet (Schrittgröße 5 µm), die Rekonstruktion erfolgte mit der Software Leica LasX. Die zugehörige Tiefenfärbung von Tag 14 ist rechts gezeigt. Maßstab 200 µm, Farbskala Tiefenfärbung rot 300 µm, blau 0 µm.

Im Vergleich zu den eingekapselten NHDF zeigte sich vor allem für GelMA *High* eine stärkere Elongation, was vermutlich durch die Strukturvorgabe der Linien des Gitters verursacht wurde. Unabhängig vom Material konnten hohe Viabilitäten erzielt werden, sodass sich sowohl GelMA als auch GelNB/GelS für den Aufbau von Gewebemodellen mit dem 3D Biodrucker eignen. Da Gewebemodelle jedoch oft empfindliche Zellen enthalten, könnte sich GelNB/GelS als geeigneter erweisen. Um dies zu überprüfen wurde ein perfundierbares Blut-Hirn-Schranke-Modell (engl.: *blood brain barrier*, BBB) auf einem Polycarbonatsubstrat (PC-Substrat) mit dem

BioSpot BP aufgebaut. Durch die Spritzenpumpen-basierte Extrusion wird der Filamentdurchmesser nicht maßgeblich durch die Nadelöffnung bestimmt, sondern durch die Druckparameter. So ist es möglich, die konische Dosiernadel mit dem ID 250 µm für verschiedene Druckvorgänge einzusetzen und den Filamentdurchmesser durch F und E zu kontrollieren. So kann auch in präzisen Strukturen eine hohe Viabilität der Zellen erreicht werden, da der Scherstress durch die verwendete Nadel reduziert werden kann.²⁰⁴

3.5.5 Aufbau eines Blut-Hirn-Schranke-Modells mit dem BioSpot BP

In vorangegangenen Arbeiten konnte ein Blut-Hirn-Schranke-Modell als *Organ-on-a-chip* im Arbeitskreis von Ute Schepers etabliert werden.²⁰⁵⁻²⁰⁷ Die Blut-Hirn-Schranke (engl.: *blood brain barrier*, BBB) bildet die physikalische, biochemische und metabolische Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem Gehirn.²⁰⁸ Sie verhindert, dass Giftstoffe und Keime ungehindert in das zentrale Nervensystem eindringen können und reguliert den Stoffaustausch, sodass zum Beispiel Ionenschwankungen verhindert werden, die die wichtigen Übermittlungsvorgänge zwischen Neuronen stören. Die eigentliche Barriere bilden die durch *Adherens Junctions* und *Tight Junctions* vernetzten Endothelzellen, die das kontinuierliche Endothel bilden. Die Endothelzellen verfügen neben den eigentlichen Transportproteinen über Effluxpumpen, die aufgenommene Moleküle wieder zurück in den Blutkreislauf transportieren können und so die Permeabilität und den Stofftransport zwischen Hirngewebe und Blutkreislauf kontrollieren.²⁰⁹ Die BBB besteht außerdem aus Perizyten, welche zu den Wandzellen zählen und die sich in der Basalmembran in direkter räumlicher Nähe zu den Endothelzellen befinden.²¹⁰ Die Astrozyten sind sternförmige Zellen, die Verknüpfung zwischen den Endothelzellen und den Neuronen. Sie wirken verstärkend auf die Ausbildung von *Tight Junctions* und regulieren die Homöostase von Neurotransmittern, Ionen und Wasser.^{211,212} Endothelzellen, Astrozyten und Perizyten sind für die Bildung der Barriere wichtig, die im cerebralen Gewebe vorhandenen Neuronen sind hier Vertreter der gewebespezifischen Zellen. Die geringe Permeabilität der BBB stellt Ärzte und Forscher seit langer Zeit vor große Herausforderungen bei der Behandlung von neurologischen Krankheiten. Die Bedeutung von *in vitro* Modellen der BBB ist enorm, da sie die Untersuchung der Funktion und Eigenschaften der BBB ermöglichen. Sonja Haase und Rebecca Pfister gelang der Aufbau des Modells ohne Neuronen mit einem 3D Bioprinter (regenHU Discovery 1. Gen).^{130,205} In Zusammenarbeit mit Nicole Pleschka (IFG, KIT) wurde mit dem BioSpot BP ein BBB-Modell aus Hydrogelen mit humanen cerebralen Perizyten (HBVP), humanen Astrozyten (HA) und humanen Neuronen (HN) aufgebaut. Die cerebralen Endothelzellen (hCMEC/D3) wurden händisch in das Modell eingebracht. Als Substrat für den 3D Druck diente ein *Organ-on-a-chip* System aus PC, das mit den verschiedenen Schichten der BBB bedruckt wurde. Durch den Druckvorgang war eine präzise Positionierung der Zellen möglich. Das *Organ-on-a-chip* System bestand aus einem Träger aus PC und einem Kanal aus einer PC-Folie, der die Geometrie eines Blutgefäßes simuliert,

mit definierten Porengrößen Die Assemblierung des Systems ist in der Abbildung 9 gezeigt. In Abbildung 61A ist der Druckvorgang gezeigt. Nach dem Abschluss des Druckvorganges wurde der Chip mit einem Deckglas verschlossen und der PC-Kanal mit Endothelzellen besiedelt. Die Kultivierung erfolgte an einer Spritzenpumpe. Der schichtweise Aufbau der BBB aus Perizyten, Astrozyten und Neuronen wurde um den PC-Kanal herum nachgebildet (Abbildung 61B). Hierzu wurden zwei Schichten aus zellenthaltendem Hydrogel aufgedruckt und der Kanal nach Assemblierung des Chips mit Hirn-Endothelzellen besiedelt.

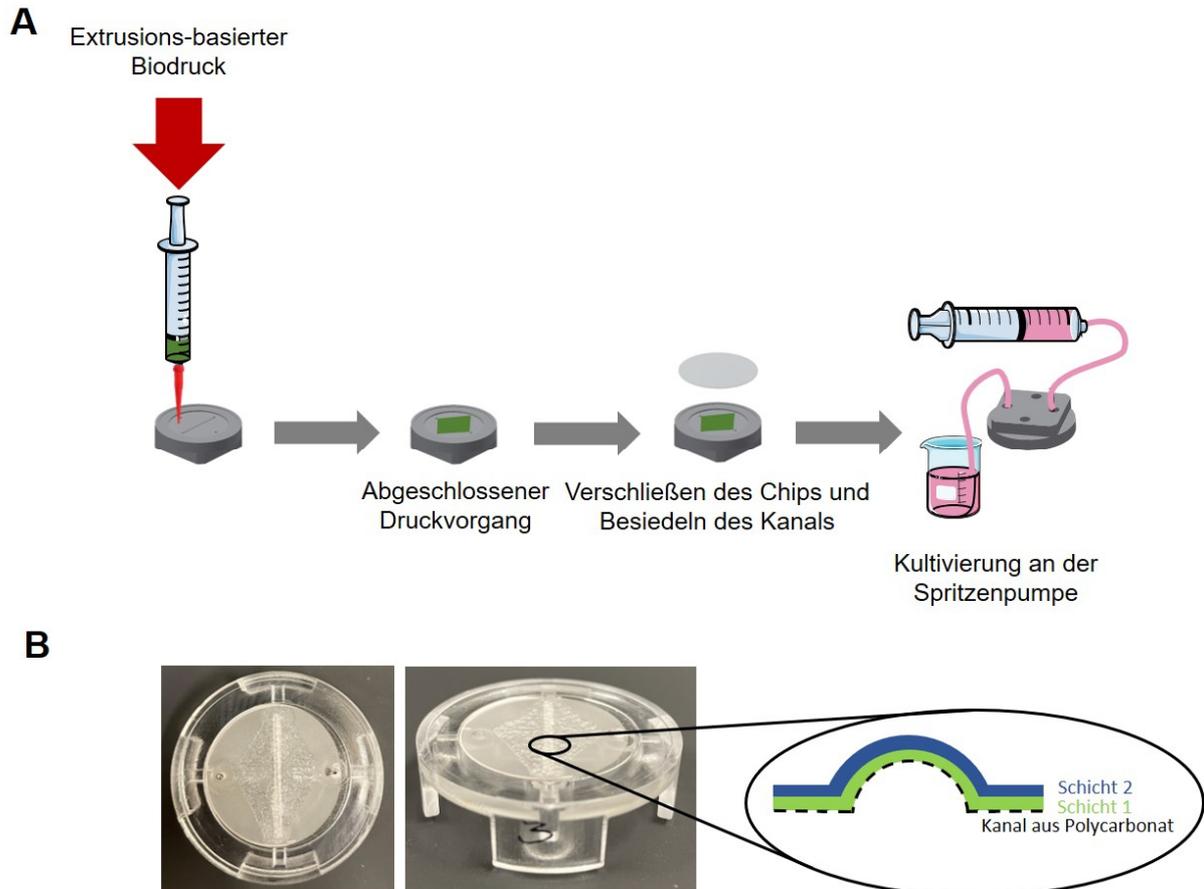


Abbildung 61: Aufbau eines BBB-Modells mit dem extrusionsbasierten 3D Biodruck am BioSpot BP. In (A) ist das generelle Vorgehen gezeigt. Auf ein Substrat aus Polycarbonat (Chip) wurden schichtweise die Zellen der Blut-Hirn-Schranke aufgedruckt. Anschließend wurde der Chip verschlossen und an eine Spritzenpumpe zur Perfusion angeschlossen. Der Aufbau des Modells ist in (B) gezeigt. Auf den Kanal aus Polycarbonat wurden zwei Schichten zellbeladener Hydrogele aufgedruckt.

Um darzustellen, dass die einzelnen Schichten korrekt um den Kanal positioniert sind und der Aufbau dadurch den *in vivo* Gegebenheiten stark ähnelt, wurde in einem ersten Schritt die Positionierung überprüft. In Abbildung 62A ist gezeigt, wie die Positionierung aussehen sollte. Das artifizielle Blutgefäß aus PC soll von einer Schicht aus HBVP umgeben sein. Als klar getrennte Schicht sollten dann HA und HN aufgedruckt werden. Nach abgeschlossenem Druckvorgang wurde der PC-Kanal mit hCMEC/D3 besiedelt.

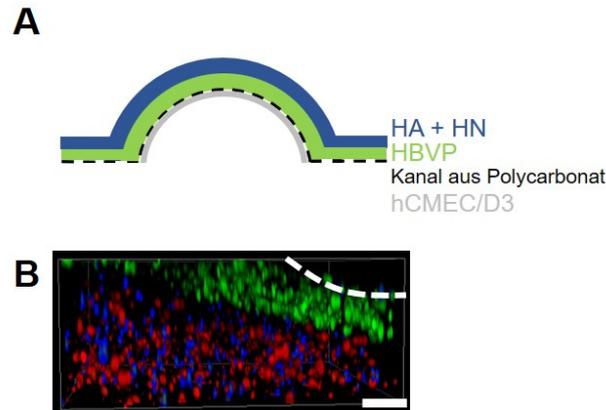


Abbildung 62: In (A) ist die schematische Darstellung des Modells gezeigt. Auf die Außenseiten des Kanals wurde zunächst eine Schicht Hydrogel mit HBVP gedruckt. Die zweite Schicht bestand aus Hydrogel mit HA und HN. Zuletzt wurde das Innere des Kanals mit HUVEC besiedelt. (B) zeigt die Anordnung der Schichten nach dem Bedrucken des PC-Substrates. Am Kanal befinden sich HBVP (CellTracker green, grün), in der zweiten Schicht befanden sich HA (CellTracker red, rot) und NHDF (HOECHST33342, blau). Die Visualisierung erfolgte mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5, 10x Objektiv, Zoom 0,75, Z-Stack 250 µm, Schrittgröße 5 µm, blau Ex.: 405 nm, Em.: 420-474 nm, grün Ex.: 496 nm, Em.: 505-580 nm, rot Ex.: 592 nm, Em.: 597-750 nm). Rekonstruktion der Z-Stacks mit Leica LasX. Der Umriss des Mikrokanals ist als gestrichelte weiße Linie dargestellt. Maßstab 200 µm.

Da HN nicht subkultiviert werden können, wurden für die Kontrolle der Positionierung HA mit NHDF verwendet. Die Vorbereitung der Tinte erfolgte analog zu Kapitel 3.5.4. Die Zellen wurden vor dem Druckvorgang mit verschiedenen Farbstoffen gefärbt (HBVP CellTracker™ green, HA CellTracker™ red und F HOECHST33342) und anschließend mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5) visualisiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 62B gezeigt. Um den Kanal zeigt sich eine durchgängiger grünfluoreszierender Layer aus Perizyten. Klar von dieser Schicht getrennt ist ein zweiter Layer zu erkennen, der eine Mischung aus HA und NHDF enthielt. Es konnte keine Vermischung der beiden Schichten erkannt werden, was einen erfolgreichen Druckvorgang bestätigte. Mit dem so erhaltenen Druckprotokoll wurde dann ein BBB-Modell aus GelMA8.0 und GelNB/GelS *Medium* mit HBVP, HA, HN und hCMEC/D3 aufgebaut. Die Auswahl des Materials ergab sich aus Experimenten von Rebecca Pfister, worin sich GelMA8.0 und GelNB/GelS *Medium* als geeignet zeigten. Außerdem ähneln die viskoelastischen Eigenschaften von GelMA8.0 und GelNB/GelS *Medium* denen des Hirngewebes.^{130,205} Der Aufbau des Modells erfolgte schichtweise, dadurch war es möglich, dass jede Schicht über Nacht inkubiert werden konnte, bevor die nächste Schicht gedruckt wurde. So wurde den Zellen Zeit gegeben, sich an die neue Umgebung anzupassen. Als erster Schritt wurden die HBVP aufgedruckt. Hierzu wurden die Zellen in Suspension gebracht und in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ HBVP/ml in die Biotinte gegeben. Nach erfolgter Temperierung wurde die erste Schicht auf das PC-Substrat gedruckt und mit dem Omnicure S2000 polymerisiert. Der Druckvorgang erfolgte für GelMA8.0 mit 0,3 % LAP und GelNB/GelS *Medium* mit 0,03 % LAP. Die polymerisierte Schicht wurde mit einer 1:1 Mischung aus Kultivierungsmedium (KM) für hCMEC/D3 und Neuronenmedium (NM)

überschichtet und über Nacht im Inkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und die zweite Schicht der BBB bestehend aus HA und HN auf die erste Schicht gedruckt. Die Tinte wurde direkt vor dem Druckvorgang angesetzt. Hierzu wurden die HA in Suspension gebracht und in einer Konzentration von $1,875 \times 10^6$ HA/ml mit $0,625 \times 10^6$ HN/ml in der jeweiligen Biotinte resuspendiert. HA und HN wurden als zweite Schicht auf die erste Schichte aufgedruckt und die Schicht mit dem Omnicure S2000 polymerisiert. Nach dem abgeschlossenen Druckvorgang wurde die gedruckte Struktur mit KM/NM 1:1 überschichtet und für 60 Min im Inkubator äquilibriert, anschließend wurde das PC-Substrat mit einem Deckglas verschlossen und mit KM/NM 1:1 befüllt. Nach der Inkubation über Nacht im Inkubator wurde der Kanal mit Kollagen I beschichtet und mit hCMEC/D3 besiedelt. Hierzu wurden die Endothelzellen in einer Konzentration von $37,5 \times 10^5$ Zellen/ml in Suspension gebracht und 20 μ l dieser Suspension in den Mikrokanal gegeben. Die Besiedlung erfolgte für 60 min bei 4 Umdrehungen/Stunde im Inkubator. Nach Ablauf der Besiedlungszeit wurden die Anschlüsse des Chips mit Medium befüllt und alles für weitere 60 min inkubiert. Abschließend wurde der Kanal mit KM/NM 1:1 gespült und an die Spritzenpumpe angeschlossen (100 μ l/Stunde). Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Am ersten Tag nach der Besiedlung mit den Endothelzellen (Tag 0) und an Tag 7 wurde eine Lebend-Tot-Färbung der Zellen in der gedruckten Struktur durchgeführt, die Endothelzellen wurden mit HOECHST33342 gefärbt. Die Visualisierung erfolgte mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie ((Leica Stellaris 5, Abbildung 63).

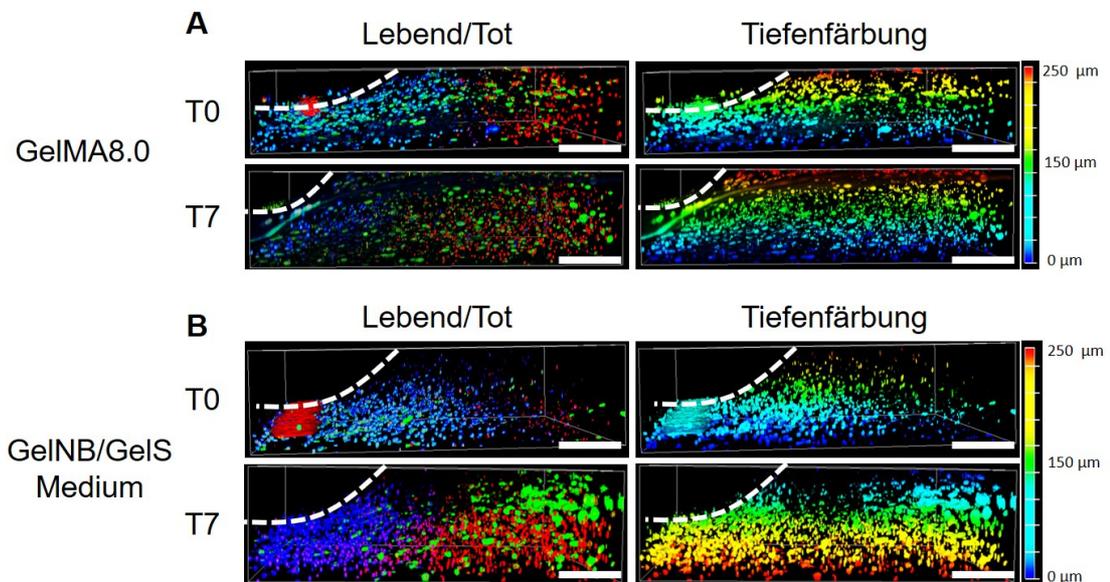


Abbildung 63: Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM und PI des gedruckten BBB-Modells auf einem PC-Substrat. Die Zellkerne der hCMEC/D3 sind mit HOECHST33342 (blau) gefärbt, lebende Zellen mit Calcein-AM (grün) und nekrotische Zellen mit PI (rot). Die Visualisierung erfolgte mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5, 10x Objektiv, Zoom 0,75, Z-Stack 250 μ m, Schrittgröße 5 μ m, blau Ex.: 405 nm, Em.: 420-474 nm, grün Ex.: 496 nm, Em.: 503-574 nm, rot Ex.: 592 nm, Em.: 598-750 nm). Rekonstruktion der Z-Stacks mit Leica LasX. Der Umriss des Mikrokanals ist als gestrichelte weiße Linie dargestellt. (A) GelMA8.0, (B) GelNB/GelS Medium. Maßstab 200 μ m.

Abbildung 63A zeigt die Lebend-Tot-Färbung des BBB-Modells aus GelMA8.0. an Tag 0. Es ist zu erkennen, dass besonders in direkter Nähe zum Kanal ein erhöhter Anteil grün fluoreszierender Zellen zu detektieren war. Mit zunehmender Entfernung vom Kanal stieg der Anteil nekrotischer Zellen. Dies könnte darin begründet sein, dass sich in der zweiten Schicht neben den HA auch Neuronen befanden, die sehr empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen sind und den Druckprozess nicht überlebt haben. Anhand der Lebend-Tot-Färbung lassen sich keine Zellarten unterscheiden, somit konnte keine eindeutige Aussage getroffen werden. Die Hoechst-Färbung der Endothelzellen zeigte kein durchgängiges Endothel an Tag 0. An Tag 7 ließen sich ebenfalls wenig viable Zellen detektieren, auch zeigte hier die Hoechst-Färbung kein durchgängiges Endothel. In der Tiefenfärbung ließ sich an beiden Zeitpunkten erkennen, dass die eingekapselten Zellen dreidimensional verteilt vorlagen. Das aus GelNB/GelS *Medium* aufgebaute BBB-Modell konnte an Tag 0 nicht erfolgreich mit Calcein-AM und PI gefärbt werden. Die Fluoreszenzen der Farbstoffe waren nur schwach zu detektieren. Eine Hoechst-Färbung ausschließlich der Zellen im Kanal war ebenfalls nicht möglich, da die Färbelösung schnell in die äußeren Schichten diffundiert und so auch die Kerne der in den Hydrogelen befindlichen Zellen gefärbt wurden. An Tag 7 war eine durchgängige Zellschicht am Kanal zu detektieren, ebenso ein großer Anteil viabler Zellen in der umliegenden Struktur. Die Tiefenfärbung zeigt, dass zu beiden Zeitpunkten 3D Strukturen vorhanden waren. Im Vergleich zu GelMA zeigte sich GelNB/GelS als geeigneter für den Aufbau eines BBB-Modells, das sich ein höherer Anteil lebender Zellen nach 7 Tagen detektieren ließ. Da durch die Färbung nicht beurteilt werden konnte, welche Zellen grün fluoreszierten, konnte keine Aussage über die spezielle Eignung eines der beiden Materialien für eine bestimmte Schicht getroffen werden. Zum Aufbau eines funktionalen BBB-Modells sollte also noch bestimmt werden, ob sich Unterschiede in der Kultivierung der verwendeten Zellen in den verschiedenen Hydrogelen zeigen. Dennoch konnte gezeigt werden, dass sich Gewebemodelle in einer definierten Struktur auf einem schon bestehenden *Organ-on-a-chip* System oder PC-Substrat durch 3D Biodruck aufbauen lassen. Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine 3D Anordnung bestand, welche sich über mehrere Tage aufrechterhalten ließ. Da sich in den Bereichen direkt am Kanal keine Viabilitätseinbußen zeigten, wurde davon ausgegangen, dass sich die Struktur durch den Kanal versorgen lässt. Da es sich bei PC um ein starres Material handelt und viele Zellen darauf erst nach einer Beschichtung mit Proteinen anwachsen, sind die Gegebenheiten nicht optimal. Der Aufbau von Gewebemodellen setzt jedoch voraus, dass sie geeignet versorgt werden können und die *in vivo* Gegebenheiten möglichst gut simuliert sind. Hierzu gehört neben der korrekten Anordnung und Funktion der Zellen auch die Durchblutung. Um dies zu erreichen, enthalten *Organ-on-a-chip* Systeme Kanäle, die ein Blutgefäß simulieren in dem sie mit Endothelzellen ausgekleidet und an eine Pumpe angeschlossen werden. Um zukünftig Gewebemodelle vollständig mit dem 3D Biodruck aufbauen zu können, besteht die

große Herausforderung darin, solche artifiziiellen Blutgefäße oder Hohlraumstrukturen aus weichen Materialien wie Hydrogelen aufzubauen.

3.5.6 Aufbau von perfundierbaren Kanalstrukturen mit dem BioSpot BP

Der Verzicht auf starre Materialien bei der Generierung von artifiziiellen Geweben, bringt vor allem aus biologischer Sicht viele Vorteile. Zellen adhäreren an weichen Materialien meist besser, auf eine aufwendige Beschichtung kann dann verzichtet werden. Des Weiteren bietet der Aufbau des gesamten Gewebes aus dem 3D Drucker den Vorteil, dass keine Substrate produziert und sterilisiert werden müssen. Zusätzlich kann auf Materialien verzichtet werden, welche die *in vivo* Gegebenheiten nur unzureichend nachbilden. Durch Kombination verschiedener Materialien zum Aufbau eines Gewebes können die unterschiedlichen Anforderungen einzelner Zellen besser erfüllt werden und die *in vivo* Gegebenheiten möglichst gut nachgebildet werden. In der Vergangenheit zeigten sich jedoch viele Herausforderungen, besonders beim Aufbau von Hohlstrukturen. Vor allem die gewünschte geringe Steifigkeit stellt ein großes Hindernis bei der Besiedlung der erhaltenen Hohlstrukturen dar. Um dies zu umgehen, wurde ein Druckprozess untersucht, welcher es ermöglichte Hohlstrukturen aus Opferstrukturen mit Endothelzellen zu bilden.²¹³ In einem zweiten Schritt wurde in Zusammenarbeit mit Michael Grün (Fakultät für Maschinenbau und Mechatronik, Hochschule Karlsruhe) eine Vorrichtung entwickelt, welche es ermöglichte die gedruckten Strukturen zu perfundieren. In Zusammenarbeit mit Alisa Grimm (IFG, KIT) wurde zunächst untersucht, ob Endothelzellen auf den polymerisierten Gelen anwachsen.

3.5.6.1 Besiedlung von Hydrogelen mit HUVEC

Um zu überprüfen, ob sich die Gele als Substrat für Endothelzellen und damit zum Aufbau artifiziieller Blutgefäße eignen, wurden HUVEC auf den Hydrogelen ausgesät (2,5D Gele). Hierzu wurden die Photopolymere in einem 8-Well μ -slide (200 μ l/Well) mit dem Omnicure S2000 polymerisiert. Anschließend wurden je 1×10^4 HUVEC in je 200 μ l EGM-2 auf die Hydrogele gegeben und bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert (Abbildung 64).

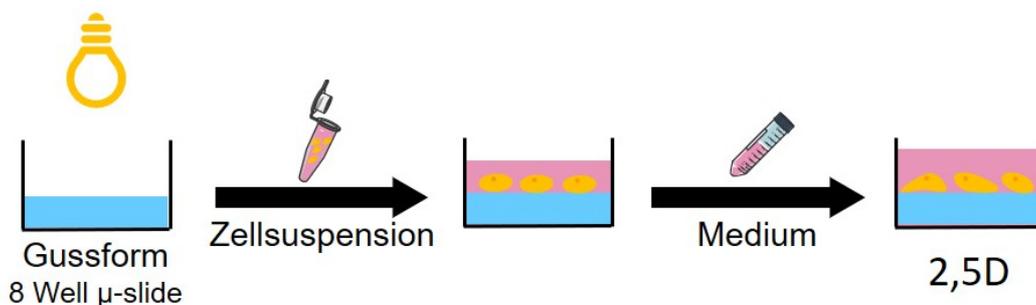


Abbildung 64: Erstellung von 2,5D Gelen mit HUVEC.

Um die adhärenierten Zellen zu visualisieren wurde an Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 eine Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM (4 μM) und PI (0,02 mg/ml) durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie und ist in Abbildung 65 gezeigt.

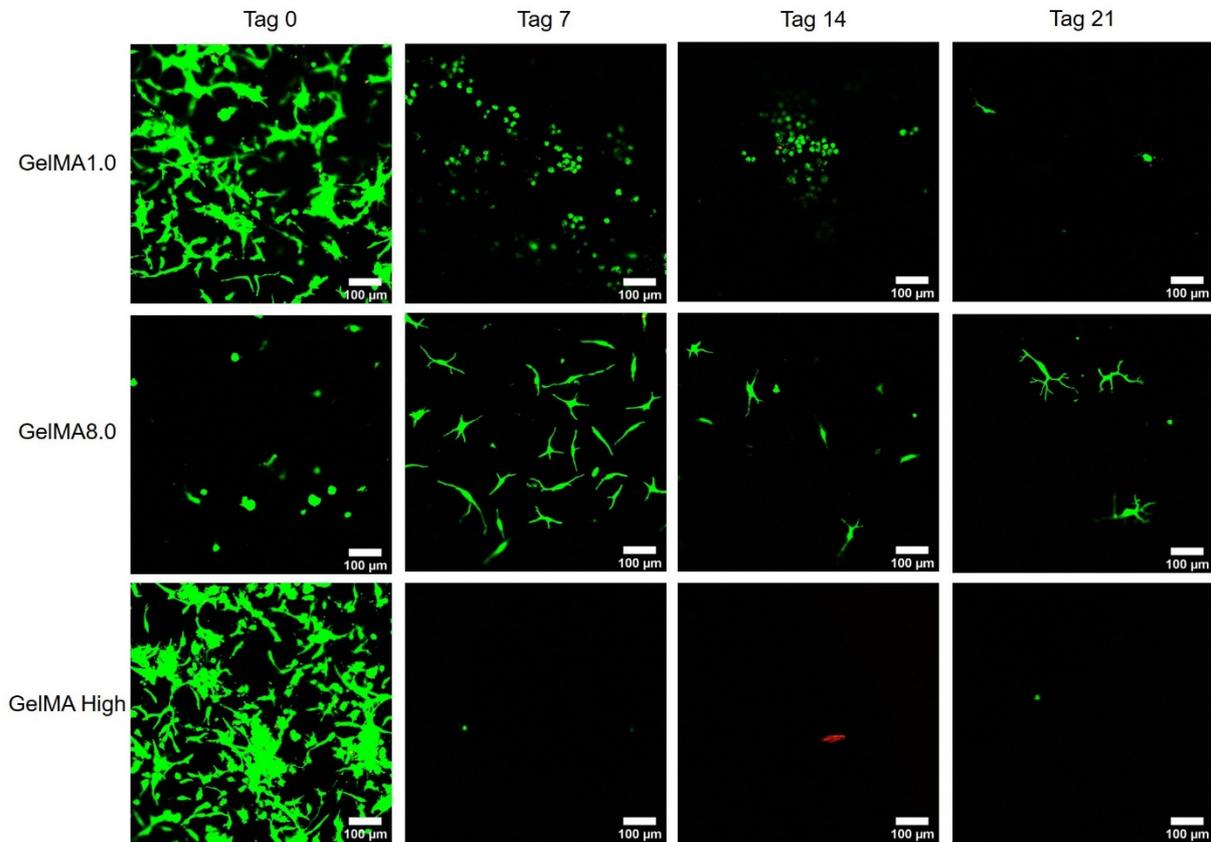


Abbildung 65: Lebend-Tot-Färbung der auf GelMA ausgesäten HUVEC. Die HUVEC wurden in einer Konzentration von 5×10^4 HUVEC/ml auf polymerisiertem GelMA ausgesät und an Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 mit Calcein-AM und PI gefärbt. Die Visualisierung erfolgte mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica TCS SPE, 10x Objektiv, Zoom 1,5). Maßstab 100 μm . In Zusammenarbeit mit Alisa Grimm (IFG, KIT).¹⁹²

An Tag 0 konnte auf GelMA1.0 und GelMA High adhärenierte und ausgerichtete HUVEC detektiert werden. Auf GelMA8.0 zeigten die HUVEC an Tag 0 keine elongierte Form. Auf GelMA1.0 konnten nach 7 beziehungsweise 14 Tagen keine elongierten HUVEC mehr detektiert werden, an Tag 21 konnten nur sehr wenig HUVEC detektiert werden. Auf GelMA High zeigten sich bereits an Tag 7 keine adhärenierten HUVEC mehr. Auf GelMA8.0 konnten ab Tag 7 elongierte HUVEC detektiert werden, die sich über 21 Tage kultivieren ließen. Eine Adhäsion von HUVEC war also auf allen GelMA-Varianten möglich, jedoch zeigten sich Unterschiede in der möglichen Dauer der Kultivierung. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich für auf GelINB/GelIS ausgesäte HUVEC. Die Visualisierung (Leica TCS SPE) dieser ist in Abbildung 66 gezeigt.

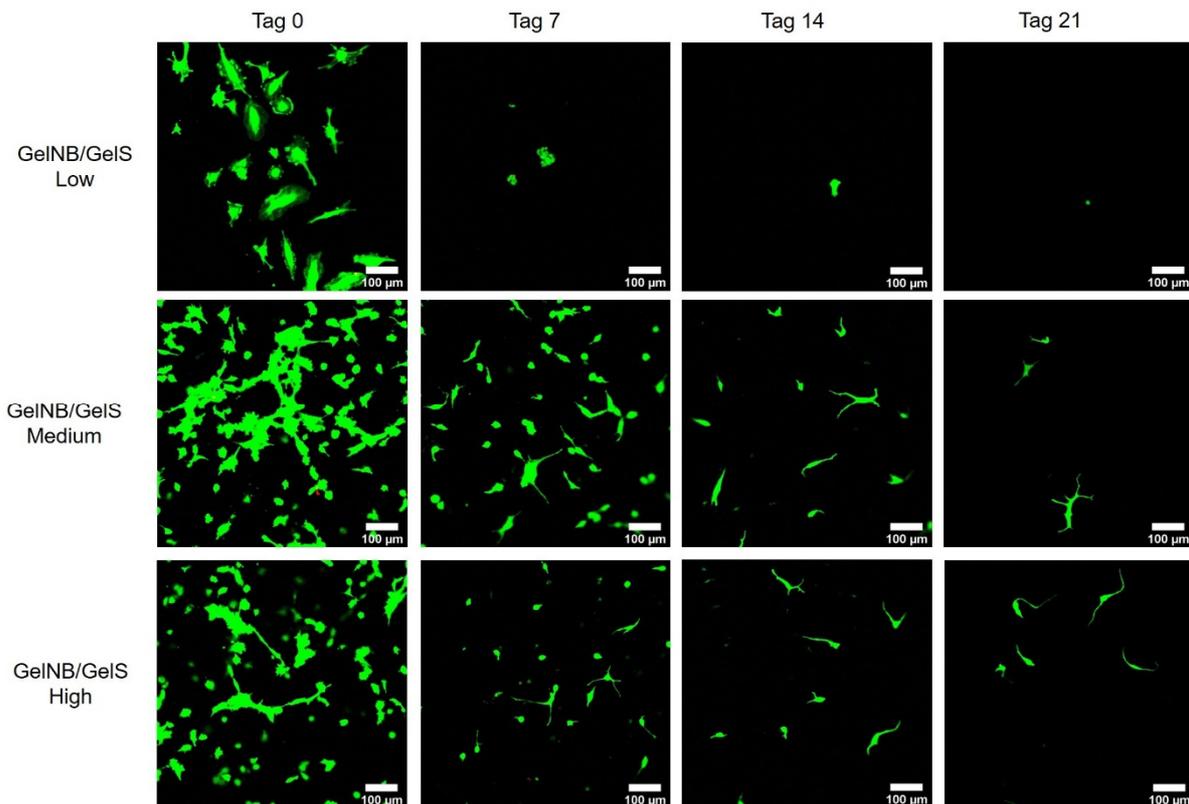


Abbildung 66: Lebend-Tot-Färbung der auf GelNB/GelS ausgesäten HUVEC. Die HUVEC wurden in einer Konzentration von 5×10^4 HUVEC/ml auf polymerisiertem GelNB/GelS ausgesät und an Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 mit Calcein-AM und PI gefärbt. Die Visualisierung erfolgte mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica TCS SPE, 10x Objektiv, Zoom 1,5). Maßstab 100 µm. In Zusammenarbeit mit Alisa Grimm (IFG, KIT).¹⁹²

An Tag 0 konnten auf allen GelNB/GelS-Varianten elongierte HUVEC detektiert werden. Auf der sehr weichen Oberfläche von GelNB/GelS *Low* ließen sich jedoch bereits ab Tag 7 nur noch vereinzelt HUVEC detektieren. Auf GelNB/GelS *Medium* und *High* war eine Kultivierung von HUVEC auf der Oberfläche über 21 Tage möglich, wobei sich besonders GelNB/GelS *High* für die lange Kultivierung eignete. Hier waren auch an Tag 21 noch elongierte HUVEC zu erkennen. Da neben der Adhäsion von Endothelzellen auch die Stabilität der Hohlstrukturen von Bedeutung ist, wurden GelMA *High* und GelNB/GelS *High* für den 3D Biodruck ausgewählt. In einem ersten Schritt wurden einfache Kanalstrukturen ohne Perfusionsmöglichkeit gedruckt. In einer Weiterentwicklung des Druckprozesses wurde eine Vorrichtung entwickelt, die einen Anschluss an eine Pumpe ermöglichte.

3.5.6.2 Aufbau von einfachen Kanalstrukturen ohne Perfusionsmöglichkeit

Der Aufbau von Hohlstrukturen mit einer Opferstruktur, die nach abgeschlossenem Druckvorgang aus der finalen Struktur entfernt wird, ist aus der Literatur bekannt. In den letzten Jahren fand diese Methode auch zunehmend im 3D Biodruck Aufmerksamkeit.²¹⁴ Die Generierung artifizieller Gewebe mit einer Kanalstruktur aus weichen Materialien fand zunehmendes Interesse. Beim Einsatz weicher Materialien zeigte sich jedoch, dass sich das Herauslösen der Opferstruktur nach dem Druckvorgang oft schwierig gestaltet. Als Material

für die Opferstruktur dienten in der Vergangenheit verschiedene Polymere und Hydrogele. So konnten zum Beispiel mit dem Polymer Pluronic-F127 als Opfermaterial erfolgreich Hohlstrukturen aufgebaut werden.^{214,215} Pluronic-F127 wird bei Temperaturen unter 10 °C flüssig und lässt sich dann aus den gedruckten Strukturen entfernen. Allerdings können Rückstände verbleiben, welche toxisch auf die später eingebrachten Zellen wirken können.²¹⁶ Besonders bei Strukturen aus weichem Material war ein intensives Auswaschen der Opferstruktur nicht möglich. Um das Auswaschen der Opferstruktur vor der Besiedlung mit Endothelzellen zu umgehen, wurde untersucht ob sich Gelatine als Opferstruktur eignet, da Zellen wegen der hohen Biokompatibilität in einer Gelatine-Lösung über längere Zeiten gehalten werden können. Dieses Vorgehen ist bereits in ähnlicher Form von Lee *et al.* beschrieben worden.²¹³ Durch die lichtinduzierte Polymerisierung der die Opferstruktur umgebenden Schichten werden diese kovalent vernetzt und bleiben bei 37 °C stabil, die Gelatine wird bei 37 °C flüssig und kann entfernt werden. In Abbildung 67 ist das Vorgehen zum Aufbau von Hohlstrukturen mit einer Opferstruktur gezeigt.

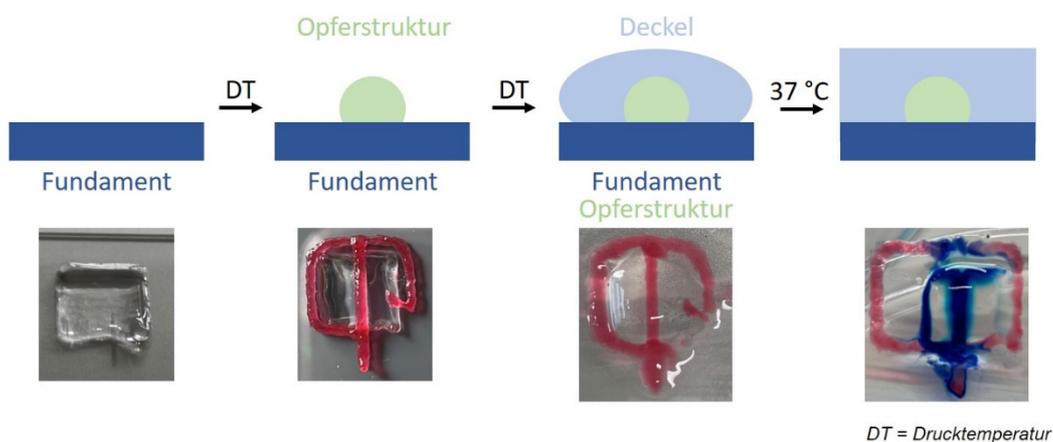


Abbildung 67: Aufbau von Kanalstrukturen mit extrusionsbasiertem 3D Biodruck. Auf ein gedrucktes Fundament aus GelMA oder GeINB/GeIS wurde eine Opferstruktur aus Gelatine (rot) aufgedruckt und mit einem Deckel aus GelMA oder GeINB/GeIS verschlossen. Die einzelnen Schichten wurden mit dem Omnicure S2000 polymerisiert. Durch Erwärmen ließ sich die Opferstruktur aus Gelatine verflüssigen und herauslösen, sodass ein durchgängiger Kanal entstand.

Zunächst wurde ein Fundament aus GelMA (5 % GelMA, 0,3 % LAP) oder GeINB/GeIS (5 % GeINB/GeIS, 0,03 % LAP) gedruckt und polymerisiert. In einem zweiten Schritt wurde die Opferstruktur aus Gelatine (5 % Gelatine in DPBS^{-/-}) aufgedruckt. Durch Kühlen der Gelatine-Lösung und des Druckbettes konnte eine ausreichende Formstabilität erreicht werden. Die Opferstruktur wurde mit einem Tropfen aus Hydrogel verschlossen und die gesamte Struktur polymerisiert. Anschließend wurde die gedruckte Struktur auf 37 °C erwärmt und die Enden des Kanals aufgeschnitten, um die flüssige Gelatine abfließen zu lassen. Durch Auftropfen einer Methylenblaulösung auf die Öffnung des Kanals konnte gezeigt werden, dass der Kanal durchgängig war. Somit konnte gezeigt werden, dass sich Gelatine als Opferstruktur eignet und ein stabiler Hohlraum erhalten wurde. Um zu vermeiden, dass die Endothelzellen in den

entstandenen Kanal pipettiert werden müssen, wurde untersucht, ob diese direkt mit der Opferstruktur verdrückt werden können.

3.5.6.2.1 Kanalstrukturen mit HUVEC

Für den Aufbau von mit Endothelzellen besiedelten Kanälen wurden die Endothelzellen (HUVEC) in der Gelatine, die zum Aufbau der Opferstruktur diente, resuspendiert. Das Vorgehen ist in Abbildung 68 schematisch dargestellt.

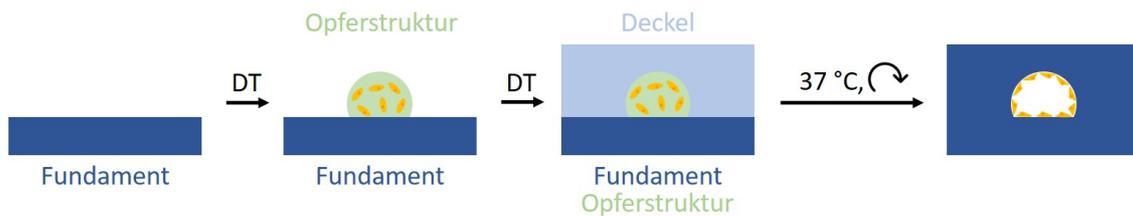


Abbildung 68: Vorgehen zum Aufbau von Kanalstrukturen mit einer Opferstruktur aus Gelatine mit HUVEC. Auf ein Fundament aus photopolymerisierbarem Hydrogel wurde eine Opferstruktur aus Gelatine gedruckt, welche HUVEC enthielt. Die Struktur wurde mit einem Deckel aus Hydrogel verschlossen und polymerisiert. Durch Drehen bei 37 °C wurde gewährleistet, dass die HUVEC gleichmäßig an den Wänden des Kanals adhären können.

Zunächst wurde ein Fundament aus GelMA oder GelNB/GelS auf einen Objektträger gedruckt und mit dem Omnicure S2000 polymerisiert. Anschließend wurde die Opferstruktur aus Gelatine mit HUVEC aufgedruckt und mit einem Deckel aus Hydrogel verschlossen. Abschließend wurde der Deckel lichtinduziert polymerisiert. Der Druckvorgang erfolgte bei der entsprechenden Drucktemperatur (Tabelle 4) mit einer konischen Dosiernadel mit einem ID von 250 µm. Das Verdrucken der Gelatine (2,5 % Gelatine in EGM-2 mit 1×10^6 HUVEC/ml) erfolgte bei 24 °C. In Abbildung 69A ist gezeigt, dass die Opferstruktur eine gleichmäßige, halbrunde Wölbung nach oben zeigte. Die hierin enthaltenen HUVEC wurden vor dem Druckvorgang mit CellTracker™ green gefärbt, um die Struktur unter dem Konfokalmikroskop zu visualisieren. Die erstellte Tiefenfärbung zeigte eine Verteilung der Zellen über eine Höhe von 350 µm. Analog wurden Strukturen gedruckt, die ungefärbte HUVEC enthielten. Um ein Austrocknen der Struktur während des Drehens im Inkubator zu verhindern (Abbildung 69B), wurden die Strukturen mit EGM-2 benetzt und mit einer Form aus PC abgedeckt. Nach einer Inkubationszeit von 120 min, wurden die Strukturen kontinuierlich mit 40 U/Stunde um die Längsachse des Kanals gedreht. Anschließend wurden die Objektträger aus der Drehvorrichtung entnommen, die Opferstruktur vorsichtig entfernt und die Strukturen mit EGM-2 überschichtet. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde eine Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM (4 µM) und PI (0,02 mg/ml) durchgeführt. Die Visualisierung der Färbung erfolgte mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5). In Abbildung 69C ist zu erkennen, dass 24 Stunden nach dem Druckvorgang und dem Herauslösen der Opferstruktur noch HUVEC im Kanal vorhanden waren. Es konnte ein hoher Anteil grün fluoreszierender HUVEC detektiert werden, was bestätigte, dass sich die Gelatine als zellbeladenen

Opferstruktur eignet. Zusätzlich war durch die Lebend-Tot-Färbung zu erkennen, dass ein Hohlraum vorhanden war. In der gezeigten Tiefenfärbung war jedoch auch zu beobachten, dass sich die adhärenierten HUVEC über eine Schichtdicke von 250 μm verteilten. Dies könnte dadurch verursacht werden, dass die flüssige Gelatine und die HUVEC in das umgebende Gel diffundiert sind oder die Opferstruktur nicht optimal entfernt wurde.

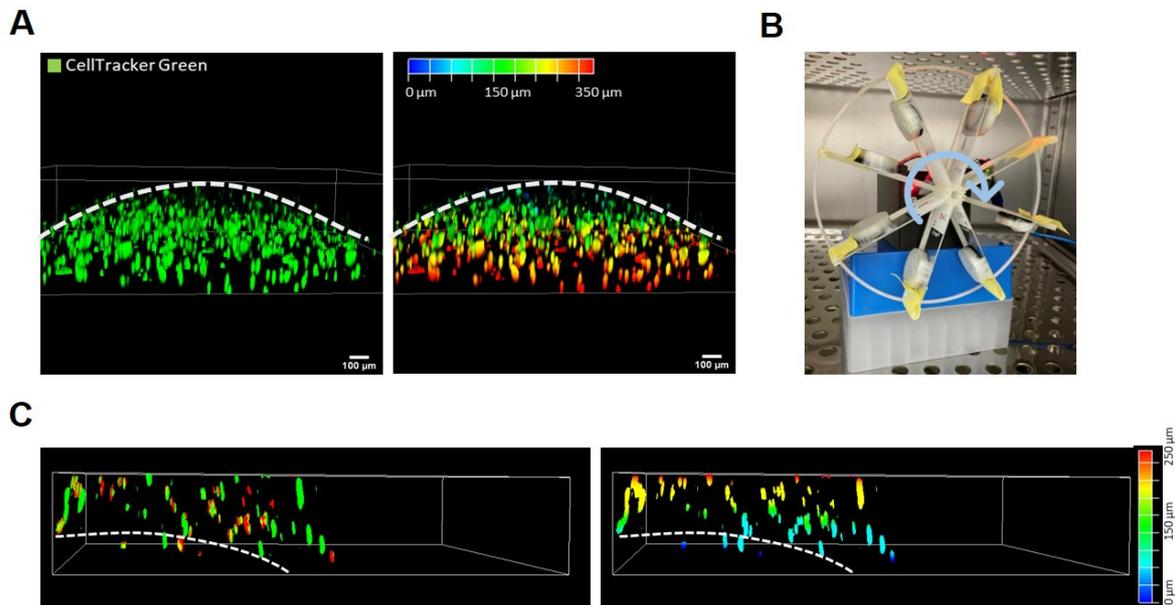


Abbildung 69: Darstellung gedruckter Kanalstrukturen aus GelMA und Gelatine. Aus GelMA und Gelatine mit HUVEC als Opferstruktur wurde eine Kanalstruktur aufgebaut. Die Visualisierung der Färbungen erfolgte mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5, 10x Objektiv, Zoom 0,75, Z-Stack Höhe 500 μm , Schrittgröße 5 μm , grün: Ex.: 494 nm, Em.: 499-544 nm). (A) CellTracker™ green Färbung von HUVEC in Gelatine nach dem Druck einer Kanalstruktur aus Gelatine und GelMA mit zugehöriger Tiefenfärbung. (B) Vorrichtung zum Drehen der gedruckten Strukturen, (C) Lebend-Tot-Färbung von HUVEC nach Anwachsen in der gedruckten Kanalstruktur mit zugehöriger Tiefenfärbung. Der Umriss der Opferstruktur ist als gestrichelte weiße Linie dargestellt. Maßstab 100 μm .

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass sich Gelatine mit HUVEC zum Aufbau von Kanalstrukturen aus photopolymerisierbaren Hydrogelen eignet. Die HUVEC zeigten eine ausreichend hohe Viabilität in der Gelatine und waren auch nach Herauslösen der Opferstruktur an den Wänden des Hohlraumes zu detektieren. Da sich die Versorgung der HUVEC ohne Zerstörung der Struktur mit zunehmender Kultivierungsdauer schwierig gestaltete, wurde in Zusammenarbeit mit Michael Grün (Fakultät für Maschinenbau und Mechatronik, Hochschule Karlsruhe) eine Vorrichtung und ein Druckprozess entwickelt, die es ermöglichten die gedruckten Kanalstrukturen zu versorgen und zu perfundieren. Insbesondere im Hinblick darauf, dass die Kanalstrukturen in Geweben sehr kleine Durchmesser aufweisen sollten, wird das Handhaben der Kanäle mit der Hand und das Versorgen mit der Pipette schwieriger.

3.5.6.3 Aufbau von Kanalstrukturen mit Perfusionsmöglichkeit

In Zusammenarbeit mit Michael Grün (Fakultät für Maschinenbau und Mechatronik, Hochschule Karlsruhe) wurde eine Möglichkeit gesucht, die gedruckten Strukturen zerstörungsfrei versorgen zu können. Hierzu wurde nach einer Möglichkeit gesucht, durch die die Anschlüsse für den Kanal während dem Druckvorgang in die Struktur integriert werden können. Die Lösung lag in der Konstruktion eines Rahmens, der während des Druckvorganges auf das bedruckte Substrat aufgesetzt wurde. Der Rahmen wurde passgenau für ein Deckglas mit den Maßen 20x45 mm² konstruiert und mit einem herkömmlichen 3D Drucker (Ultimaker Extended, Ultimaker BV) aus Polycarbonat (Ultimaker PC, Ultimaker BV) ausgedruckt. Die Maße sind Abbildung 114 (Anhang) zu entnehmen. Als Boden und Deckel des Rahmens dienten Deckgläser. Mit dem MX-System war es möglich Kanalstrukturen aufzubauen, die perfundiert werden konnten.

3.5.6.3.1 MX-System

Das aus PC und Glas bestehende MX-System diente zur Versorgung von gedruckten Hohlstrukturen und deren Perfusion. Das System besteht aus einem Rahmen aus PC mit vier Dosiernadeln und jeweils einem Deckglas der Maße 20x54 mm² als Boden und Deckel. In Abbildung 70A ist ein 3D Modell des MX-Systems gezeigt, die genauen Maßen sind der technischen Zeichnung im Anhang zu entnehmen (Abbildung 114). Durch den Anschluss der Dosiernadeln an eine Pumpe oder Spritze konnte die sich im Inneren befindende 3D gedruckte Struktur versorgt werden. Die beiden Dosiernadeln an den langen Seiten waren durch die gedruckte Hohlstruktur verbunden, wodurch ein Kanal entstand. Die umgebende Struktur konnte zusätzlich durch die Dosiernadeln an den kurzen Seiten versorgt werden. In Abbildung 70B ist ein bedrucktes und verschlossenes MX-System gezeigt. Die gedruckte Struktur befindet sich zwischen den beiden Deckgläsern. Waren Zellen in der Opferstruktur enthalten, so wurden diese durch kontinuierliches Drehen um die Längsachse des Kanals an die Wände der Opferstruktur gebracht. Das Gerät zum Drehen der Systeme ist in Abbildung 70C gezeigt.

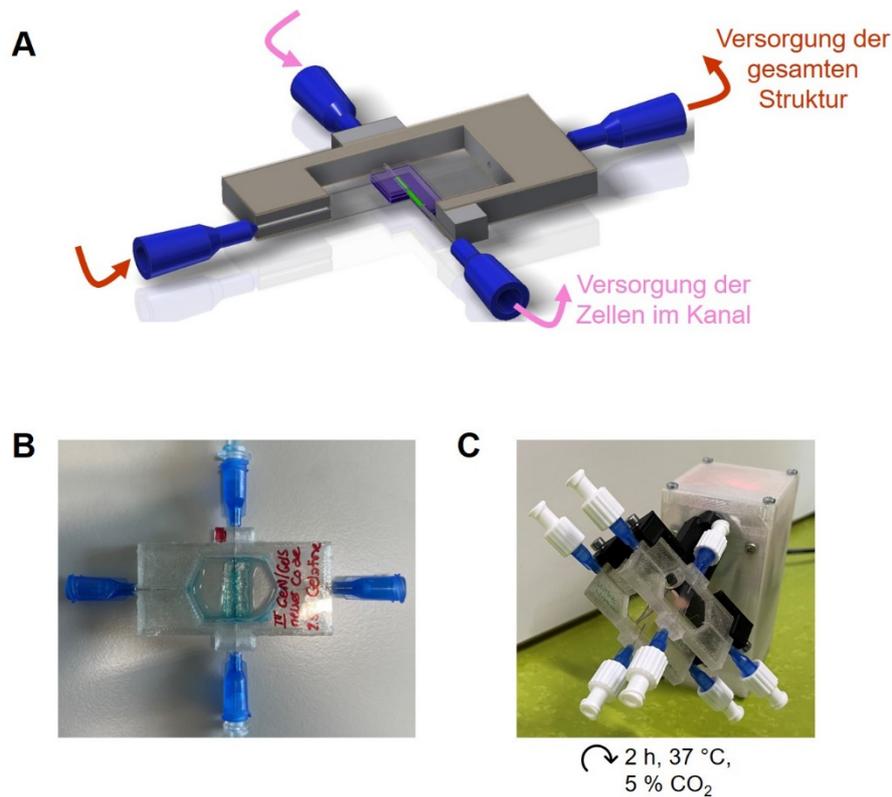


Abbildung 70: (A) 3D Darstellung der Vorrichtung zum Anschluss der Struktur an eine Pumpe. Die als MX-System bezeichnete Vorrichtung besteht aus 2 Deckgläsern, einem Rahmen aus Polycarbonat mit eingebauten Dosiernadeln. Durch bedrucktes Deckglas und aufbringen des MX-Systems konnten Kanalstrukturen gedruckt werden, die über die Dosiernadeln an eine Pumpe angeschlossen werden konnten. (B) Bedrucktes und geschlossenes MX-System. (C) Gerät zum Drehen der bedruckten MX-Systeme zur Besiedlung mit HUVEC. In Zusammenarbeit mit Michael Grün (Fakultät für Maschinenbau und Mechatronik, Hochschule Karlsruhe).

Der Aufbau einer Kanalstruktur im MX-System erfolgte mit einem ähnlichen Druckprozess wie in Kapitel 3.5.6.2., das Vorgehen ist in Abbildung 71 gezeigt.

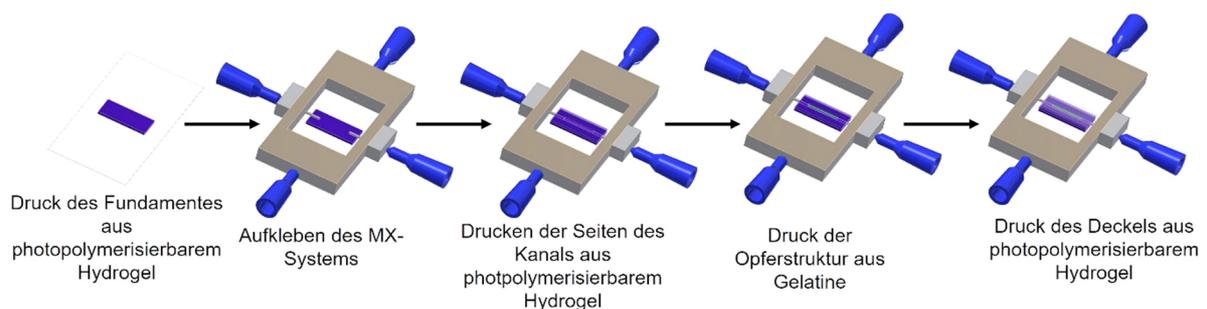


Abbildung 71: Darstellung des Druckprozesses einer Kanalstruktur im MX-System. Nach dem Druck des Fundamentes auf ein Deckglas wurde der PC-Rahmen aufgeklebt und die Seitenränder des Kanals gedruckt. Anschließend wurde die Opferstruktur aus Gelatine aufgebracht und mit einem Deckel aus GelMA oder GelNB/GelS verschlossen. Die Aushärtung erfolgte schichtweise mit dem Omnicure S2000. Nach Abschluss des Druckvorganges wurde das MX-System mit einem Deckglas verschlossen und mit DPBS⁻ gefüllt. Durch Erwärmen des gesamten Systems wurde die Opferstruktur verflüssigt und konnte herausgelöst werden. Waren Zellen in der Opferstruktur enthalten, so wurde das gesamte System im Inkubator für 2 Stunden kontinuierlich um die Längsachse des Kanals gedreht um ein gleichmäßiges Anwachsen der Zellen an den Wänden des Kanals zu ermöglichen.

Auf das Deckglas, das durch eine spezielle Halterung auf dem Druckbett des BioSpot BP fixiert wurde, wurde als erster Schritt ein mehrschichtiges Fundament aus einem

photopolymerisierbaren Hydrogel gedruckt und schichtweise mit dem Omnicure S2000 polymerisiert. Nach erfolgreichem Druck des Fundamentes wurde der PC-Rahmen des MX-Systems aufgeklebt. Hierfür wurde der Rahmen mit doppelseitigem Klebeband (VHB-Transfer Klebeband, 3M) versehen und auf das Deckglas geklebt. Die beiden Dosiernadeln an den langen Seiten befanden sich hierbei in der Mitte der kurzen Seiten des Fundamentes. Die Dosiernadeln wurden durch das Aufkleben leicht in das Fundament gedrückt, um zu gewährleisten, dass die Übergänge vom Kanal in die Dosiernadeln nach abgeschlossenem Druckvorgang dicht waren. Anschließend wurden die Seiten des Kanals gedruckt und schichtweise polymerisiert. Zusätzlich wurden die Dosiernadeln in diesem Schritt überdruckt, um die Dichtigkeit des Kanals zu erhöhen. Anschließend wurde die Opferstruktur aus Gelatine zwischen die Dosiernadeln in die entstandene Vertiefung gedruckt. Als letzten Schritt wurde die Struktur mit einem Deckel aus Hydrogel versehen, der ebenfalls schichtweise mit Licht polymerisiert wurde. Das bedruckte MX-System wurde durch das Aufkleben eines Deckglases verschlossen. Als photopolymerisierbare Hydrogele wurde sowohl GelMA *High* als auch GelNB/GelS *High* in einer Konzentration von 5 % verwendet. Der Druckvorgang erfolgte mit einer Dosiernadel mit dem ID 250 μm mit der ermittelten Drucktemperatur (Tabelle 4, Gelatine 24 °C). Da für das Integrieren der Dosiernadeln in die Struktur ein exaktes Ablegen des Filaments entlang der Dosiernadeln nötig war, wurde die Achsengeschwindigkeit reduziert ($F = 5 \text{ mm/s}$). Um ein gleichbleibend dünnes Filament (Durchmesser_{theor} 0,34 mm) zu erhalten wurde $E = 0,006 \text{ mm/s}$ gewählt. Der Druck des Kanals aus Gelatine erfolgte mit $F = 10 \text{ mm/s}$ und $E = 0,02 \text{ mm/s}$. Die Besonderheit des MX-Systems besteht darin, dass es zum einen flexibel an unterschiedliche Dimensionen angepasst werden kann. Durch das Einsetzen von Dosiernadeln mit einem kleineren oder größeren Innendurchmesser können die Anschlüsse an die gedruckten Strukturen angepasst werden. Zusätzlich ist das System unabhängig davon, welche Struktur zwischen die Dosiernadeln gedruckt wird. Die einfache Herstellung und Handhabung sind weitere Vorteile. In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob sich der entwickelte Druckprozess auch für den Aufbau von Gewebemodellen eignet, ob ein Hohlraum vorhanden ist und ob dieser auch über längere Zeiträume stabil ist. Hierzu wurde eine Co-Kultur aus NHDF und HUVEC genutzt.

3.5.6.3.2 Bedrucken des MX-Systems mit Hydrogelen mit HUVEC und NHDF

Aus Photopolymerlösungen mit NHDF und Gelatine mit HUVEC wurde eine Kanalstruktur im MX-System aufgebaut, welche dem Nachweis der erwünschten Positionierung und der Untersuchung des Hohlraumes diene. Zur Vorbereitung der verwendeten Biotinten wurden die Zellen in Suspension gebracht und in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ NHDF/ml in die Photopolymerlösungen eingebracht. Es wurden 5 % GelMA *High* (0,3 % LAP) und GelNB/GelS *High* (0,03 % LAP) verwendet und mit konischen Dosiernadeln mit einem ID von 250 μm bei den ermittelten Parametern gedruckt. Die HUVEC wurden in einer Konzentration

von $1,25 \times 10^6$ HUVEC/ml in die Gelatine (2,5 % in EGM-2) eingebracht, der Druck der Opferstruktur erfolgte bei 24 °C. Da die Stabilität der Struktur und der Druckprozess im Fokus lagen, wurden jeweils die High Varianten der Hydrogele verwendet, obwohl GelMA8.0 eine bessere Adhäsion der HUVEC als GelMA High zeigte (Kapitel 3.5.6.1). Zur Darstellung der Opferstruktur wurden die HUVEC vor dem Verdrucken mit CellTracker™ green gefärbt, die NHDF mit CellTracker™ red. In Abbildung 72A ist schematisch das Vorgehen gezeigt. Sowohl die Opferstruktur, als auch die umgebende Struktur enthielten Zellen. Analog zum Vorgehen ohne das MX-System wurde zunächst ein Fundament gedruckt und polymerisiert. Anschließend erfolgte das Aufsetzen des Rahmens und das Drucken der Seiten. Der Druck der Opferstruktur wurde gefolgt vom Druck des Deckels aus photopolymerisierbarem Hydrogel dessen Polymerisation. Nach Abschluss des Druckvorgangs wurde das MX-System mit einem Deckglas verschlossen und um die Längsachse des Kanals gedreht.

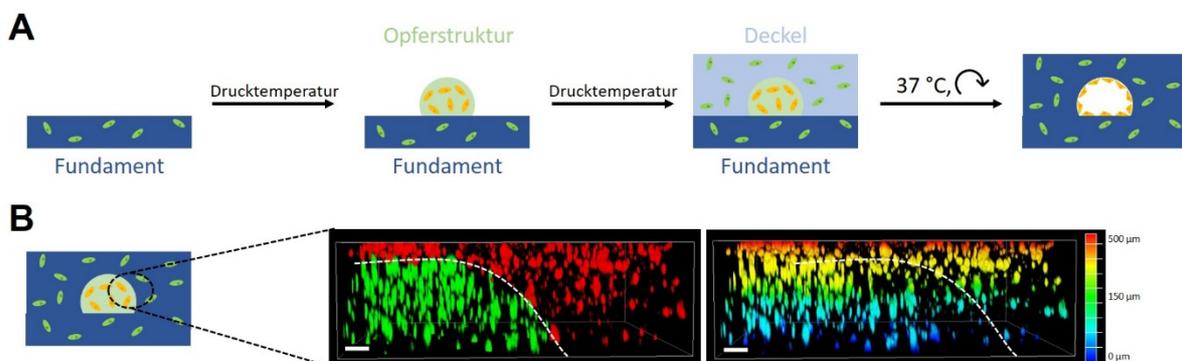


Abbildung 72: Aufbau einer Kanalstruktur mit HUVEC und NHDF aus Hydrogelen. (A) Vorgehen zum Aufbau der Kanalstruktur aus Hydrogel und Gelatine. Ein Fundament aus einem photopolymerisierbaren Hydrogel wurde mit einer Opferstruktur aus Gelatine bedruckt und diese mit Hydrogel eingedeckelt. Die einzelnen Schichten wurden mit dem Omnicure S2000 polymerisiert. Nach Beendigung des Druckvorganges wurde die Struktur unter Drehen erwärmt um ein Anwachsen der Zellen an den Wänden des Kanals zu ermöglichen. (B) Nachweis der korrekten Positionierung von Endothelzellen und NHDF. Die in der Opferstruktur enthaltenen HUVEC ($1,25 \times 10^6$ HUVEC/ml) wurden vor dem Druck mit CellTracker™ green gefärbt, die umgebenden NHDF ($2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) mit CellTracker™ red. Es ist eine klare Trennung der Opferstruktur vom umgebenden Material zu erkennen. Die Visualisierung erfolgte mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5, 10x Objektiv, Zoom 0,75, Z-Stack Höhe 500 µm, Schrittgröße 5 µm, grün: Ex.: 494 nm, Em.: 499-544 nm, rot: Ex.: 549 nm, Em.: 591-725 nm). Der Umriss der Opferstruktur ist als gestrichelte weiße Linie dargestellt. Maßstab 100 µm.

Abbildung 72B zeigt die Visualisierung der gedruckten Struktur mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Leica Stellaris 5). Es ist in der Abbildung zu erkennen, dass die beiden Schichten aus Gelatine und Hydrogel klar getrennt waren, es fand keine Durchmischung der gedruckten Schichten während oder nach dem Druckvorgang statt. Die rot gefärbten NHDF wurden durch die lichtinduzierte Polymerisation eingekapselt und konnten sich nicht mit den HUVEC vermischen. Die Färbung erfolgte ohne Erwärmen der Opferstruktur, wodurch auch die Gelatine ihre Struktur nicht veränderte. In der Tiefenfärbung zeigte sich, dass eine gleichmäßige Verteilung der Zellen über den gesamten Z-Stack mit einer Höhe von 500 µm vorlag. Um zu überprüfen, ob die Zellen den Druckvorgang unbeschadet überstanden haben

und das Entfernen der Opferstruktur zu einem Hohlraum führte, wurden Biotinten vorbereitet, die ungefärbte NHDF beziehungsweise HUVEC enthielten. Die Vorbereitung erfolgte analog zu den Biotinten mit gefärbten HUVEC und NHDF, ebenso der Druckvorgang. Nach dem Drehen der Systeme für 2 Stunden im Inkubator wurde die Opferstruktur vorsichtig mit einer Spritze entfernt und die Färbelösung sowohl in den Kanal als auch in das umgebende Kompartiment gegeben. Die Lebend-Tot-Färbung wurde mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5) visualisiert. Es wurde sowohl für GelMA *High* als auch GelNB/GelS *High* an Tag 0 ein Hohlraum detektiert. Es ist jedoch in Abbildung 73 zu erkennen, dass für GelNB/GelS *High* ein ausgeprägter Hohlraum als für GelMA *High* vorlag. Möglicherweise reichte die Stabilität von GelMA *High* nicht aus um einen Hohlraum zu bilden, der dem Entfernen der Opferstruktur standhielt. Für beide Hydrogele zeigte sich, dass die enthaltenen Zellen gleichmäßig über alle Ebenen des Z-Stacks verteilt vorlagen. Wie erwartet, wurde in GelNB/GelS *High* ein größerer Anteil grün fluoreszierender Zellen festgestellt.

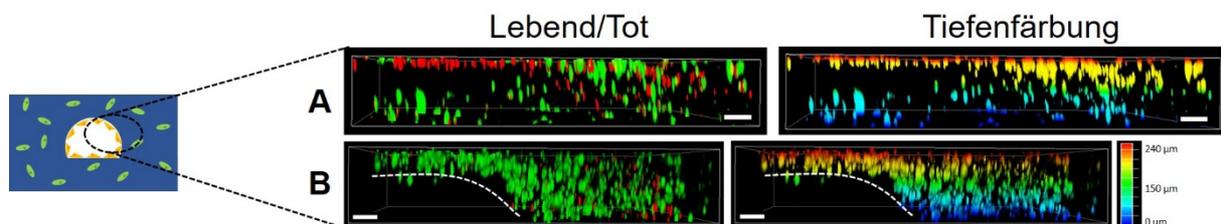


Abbildung 73: Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM und PI der in den gedruckten Strukturen eingekapselten Zellen an Tag 0. Die Visualisierung erfolgte mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5, 10x Objektiv, Zoom 0,75, Z-Stack Höhe 250 µm, Schrittgröße 5 µm, grün: Ex.: 494 nm, Em.: 499-544 nm, rot: Ex.: 549 nm, Em.: 591-725 nm). (A) GelMA *High*, (B) GelNB/GelS *High*. Der Umriss der Opferstruktur ist als gestrichelte weiße Linie dargestellt. Maßstab 100 µm.

Zur Überprüfung der Stabilität wurde an Tag 7 erneut eine Lebend-Tot-Färbung durchgeführt. Die Kultivierung der bedruckten Systeme erfolgte statisch in EGM-2, das Medium wurde alle 48 Stunden gewechselt. Die Strukturen aus GelMA *High* konnten nicht mehr gefärbt werden, weshalb in Abbildung 74 nur die Färbungen von GelNB/GelS *High* dargestellt sind. In Abbildung 74A sind die aufgenommenen Z-Stacks für GelNB/GelS *High* an Tag 0 und Tag 7 in der Seitenansicht gezeigt. Es konnte zu beiden Zeitpunkten ein Hohlraum detektiert werden. An Tag 7 zeigte sich eine geringe Verminderung des Durchmessers. Ob dies durch das Quellen des Hydrogels verursacht wurde oder der Kanal von Beginn an einen kleineren Durchmesser aufwies konnte nicht geklärt werden. Der Anteil rot fluoreszierender Zellen blieb über die Kultivierungsdauer von 7 Tagen auf niedrigem Niveau.

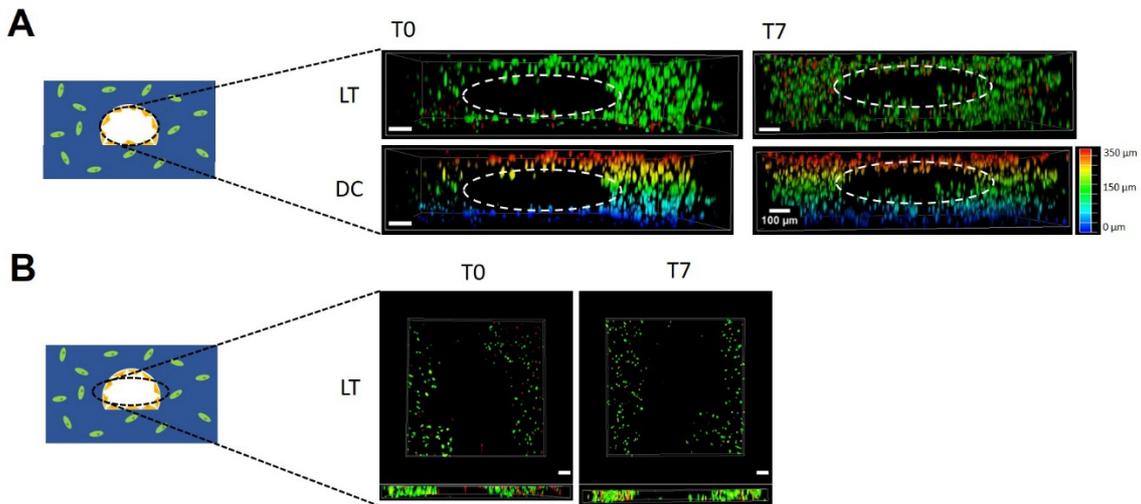


Abbildung 74: Lebend-Tot-Färbung der eingekapselten Zellen in den aus GelNB/GelS High gedruckten Kanalstrukturen an Tag 0 und Tag 7. Es ist zu beiden Zeitpunkten ein Hohlraum erkennbar. Die Visualisierung der Färbung mit Calcein-AM und PI erfolgte mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5, 10x Objektiv, Zoom 0,75, Z-Stack Höhe 350 µm, Schrittgröße 5 µm, Schrittgröße 5 µm, grün: Ex.: 494 nm, Em.: 499-544 nm, rot: Ex.: 549 nm, Em.: 591-725 nm). (A) Seitenansicht der aufgenommenen Struktur, (B) Aufsicht auf die aufgenommene Struktur und Seitenansicht der Mitte des Hohlraumes. Der Umriss der Opferstruktur ist als gestrichelte weiße Linie dargestellt. Maßstab 100 µm.

Abbildung 74B zeigt die Aufsicht der Mitte des Hohlraumes. Es ist eine klare Abgrenzung der zellhaltigen Struktur vom Hohlraum zu erkennen, was verdeutlichte, dass sowohl an Tag 0 als auch an Tag 7 eine durchgängige Kanalstruktur vorlag. Es konnte gezeigt werden, dass sich mit dem entwickelten Druckprozess und dem MX-System Kanalstrukturen drucken lassen, die Zellen enthalten können und auch nach 7 Tagen Kultivierungsdauer noch einen Hohlraum aufweisen. Für GelNB/GelS High wurden stabilere Strukturen als für GelMA High erhalten, was möglicherweise auf eine falsche Handhabung oder eine fehlerhafte Synthese des Materials zurückzuführen war, da die Stabilität beider Hydrogele im polymerisierten Zustand ähnlich ist.¹³⁰ Erneut konnte gezeigt werden, dass sich GelNB/GelS High besser für den Aufbau von Gewebemodellen eignet, da die Viabilitäten der eingekapselten Zellen insgesamt höher waren, als die in GelMA High detektierten. Es konnte keine Aussage darüber getroffen werden, wie gut die HUVEC angewachsen sind. Da sich bei der Besiedlung der Hydrogele zeigte, dass Endothelzellen auf GelMA8.0 besser adhären als auf GelMA High sollte auch dieses Material auf seine Eignung für den Aufbau von Hohlstrukturen überprüft werden. Dies wurde in einem weiteren Experiment ausgeführt. Hohlraumstrukturen aus GelMA8.0 und GelNB/GelS High wurden gedruckt und nach Entfernen der Opferstruktur an eine Peristaltikpumpe angeschlossen.

3.5.6.3.3 Anschluss an Pumpe und Diffusion

Um ein Gewebe möglichst gut zu simulieren, muss auch die Durchblutung nachgeahmt werden. Dies wird im *Tissue Engineering* durch den Anschluss des artifiziellen Gewebes oder Modell an eine mikrofluidische Pumpe realisiert. Die Pumpe fördert Zellkulturmedium und

Zusätze mit einer definierten Flussgeschwindigkeit durch die angeschlossene Struktur. Die durch das Fließen des Mediums in der Kanalstruktur entstehenden Scherkräfte setzen die enthaltenen Zellen mechanischen Reizen aus und sind für die korrekte Anordnung und Funktion der Zellen wichtig.²¹⁷ Gleichzeitig findet eine kontinuierliche Zufuhr von Nährstoffen statt. Durch richtige Kombination von Pumpe, Steuerung, Schlauchdurchmesser und Kanalform und -durchmesser können die im Kanal herrschenden Flussbedingungen genau eingestellt und an das zu simulierende Gewebe angepasst werden. Um abschließend zu klären, ob sich die gedruckten Kanalstrukturen zum Anschluss an eine Pumpe eignen, wurden die Strukturen erwärmt, die Opferstruktur entfernt und das MX-System an eine Peristaltikpumpe (Wantai Nema 17 Schrittmotor 40mm 1.7A, 150 U/min, Übersetzung 25:1) angeschlossen. In Abbildung 75A ist der Aufbau gezeigt. Das bedruckte MX-System (5 % GelMA8.0 mit 0,3 % LAP/GelNB/GelS High mit 0,03 % LAP, ohne Zellen) wurde mit einem Tygenschlauch (ID 0,76 mm) verbunden und der Schlauch durch eine Peristaltikpumpe geführt. Aus einem Reservoir wurde Methylenblaulösung mit einer Flussrate von 562 $\mu\text{l}/\text{min}$ durch den Kanal gefördert. In der Abbildung ist zu erkennen, dass sowohl für GelNB/GelS *High* als auch für GelMA8.0 eine Blaufärbung des Kanals nach Anschluss an die Pumpe zu erkennen war. Beide Strukturen wurden von der Methylenblaulösung mit der Pumpe durchspült. Es zeigte sich jedoch auch, dass der Kanal aus GelMA8.0 eine geringere Dichtigkeit aufwies als jener aus GelNB/GelS *High*. Dies ist bereits im Druckvorgang begründet, in dem immer wieder der Effekt auftrat, dass sich die Struktur aus GelMA8.0 bei der Polymerisierung zusammenzog. Durch diesen Effekt war die Überlappung von Struktur und Dosiernadeln zu gering, um eine Dichtigkeit zu gewährleisten. Für GelNB/GelS *High* wurde das Schrumpfen der Struktur bei der Polymerisierung nicht beobachtet. Da Blutgefäße Gewebe und Organe *in vivo* versorgen, sollte zusätzlich überprüft werden, ob kleine Moleküle aus dem Kanal in die umgebende Struktur austreten können. In Kapitel 3.4.5 konnte bereits gezeigt werden, dass alle Hydrogele von kleinen Molekülen gut durchdrungen werden können und eine Kultivierung von NHDF in großen Strukturen möglich ist. Um zu überprüfen, ob die Diffusion kleiner Moleküle auch aus einer fließenden Flüssigkeit in die umgebende Struktur möglich ist, wurden die Kanäle mit einer Methylenblaulösung perfundiert und die Blaufärbung der Struktur fotografisch dokumentiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 75B gezeigt. Zum Zeitpunkt T0 war eine starke Blaufärbung ausschließlich des Kanals zu erkennen. Bereits nach 5 min war eine leichte Blaufärbung der gesamten Struktur zu detektieren. Nach 60 min war die gesamte Struktur blau gefärbt. Wie schon für die großen Strukturen konnte gezeigt werden, dass kleine Moleküle gut in die Struktur diffundieren. Somit sollte eine Versorgung der gedruckten Struktur möglich sein. Es konnte jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob und wie gut große Moleküle durch die Gele diffundieren.

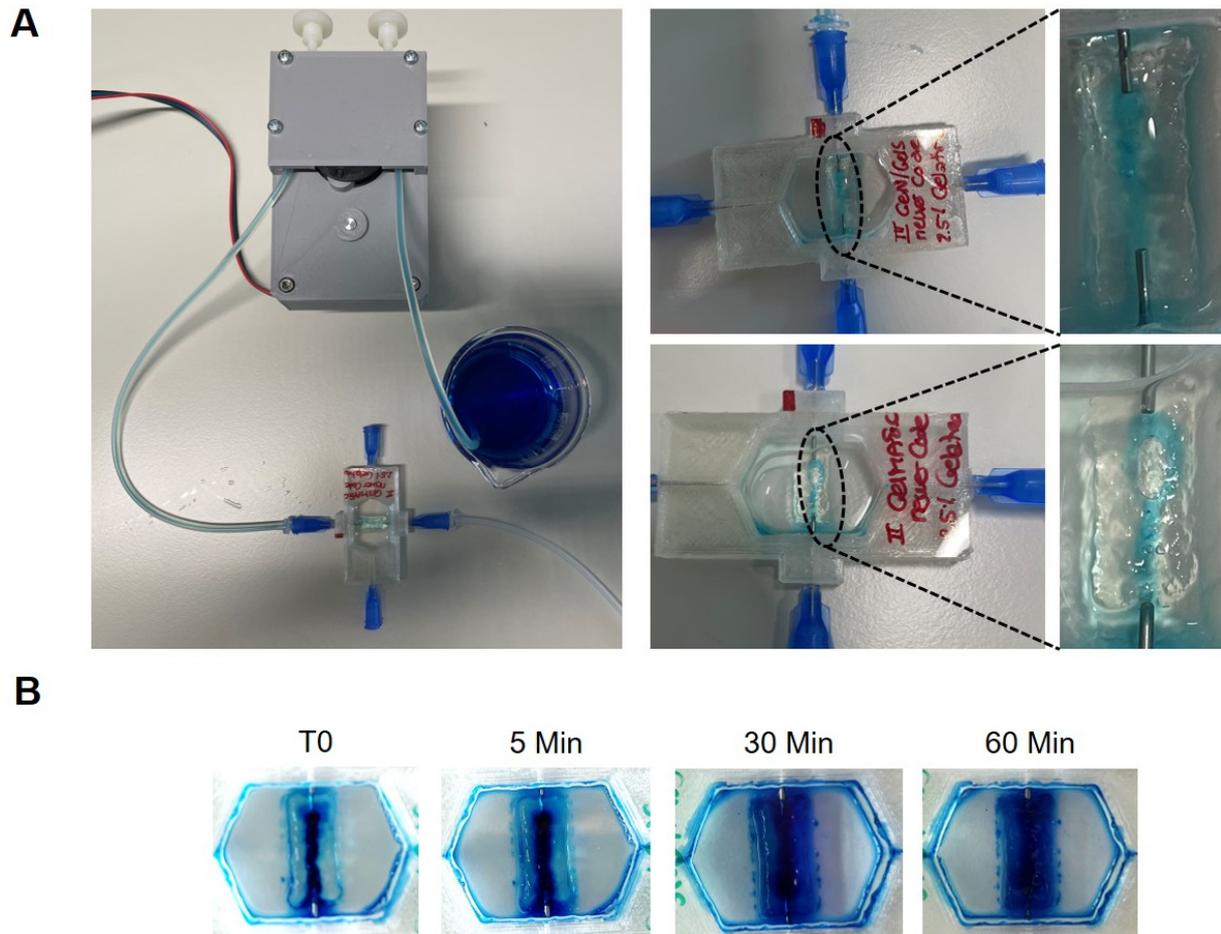


Abbildung 75: Aus GelMA8.0 und GelNB/GelS High wurden Kanalstrukturen mit dem BioSpot BP aufgebaut, die an eine Peristaltikpumpe angeschlossen wurden. Die Kanäle wurden mit Methylenblaulösung gefüllt und die Diffusion in die umgebende Struktur beobachtet. Exemplarische Darstellung mit GelMA8.0 und GelNB/GelS High. (A) Fotografische Aufnahme der angeschlossenen Peristaltikpumpe und Detailansicht der gedruckten Kanäle während der Perfusion mit Methylenblaulösung. (B) Fotografische Aufnahme der Kanäle nach dem Befüllen mit Methylenblaulösung. Die Lösung diffundiert gleichmäßig mit der Zeit aus dem Kanal in die umgebende Struktur.

Nach erfolgter Bestimmung der Druckparameter am BioSpot BP für die einzelnen Biotinten, wurde gezeigt, dass sich Fibroblasten mit hohen Viabilitäten verdrucken lassen. Im Anschluss wurde ein BBB-Modell auf einem *Organ-on-a-chip* System aus PC mit dem 3D Biodrucker erfolgreich aufgebaut. Es zeigte sich erneut ein leichter Vorteil des GelNB/GelS Gels gegenüber dem GelMA Gel als Biotinte. In einem weiteren Schritt wurden Kanalstrukturen aus Hydrogelen aufgebaut. Es wurde zunächst ein Druckprozess entwickelt, mit dem sich die Kanalstrukturen mit Endothelzellen besiedeln ließen. Durch das Einbringen der Endothelzellen in das Opfermaterial konnte ein Zerstören der gedruckten Struktur durch die Handhabung beim Besiedeln vermieden werden. Um die gedruckte Kanalstrukturen später an ein Pumpensystem anschließen zu können, wurde eine Vorrichtung entwickelt, die ein Anschluss an eine Pumpe ermöglichte. Durch das sogenannte MX-System war es möglich zylindrische Dosiernadeln in die gedruckte Struktur zu integrieren. Der Aufbau der Kanalstrukturen erfolgte zunächst ohne Zellen, um den Druckprozess zu optimieren. Abschließend wurden Kanalstrukturen aus Biotinten mit HUVEC und NHDF aufgebaut und statisch kultiviert. Die gedruckten Hohlräume

waren in GelNB/GelS High über mindestens 7 Tage stabil. In einem abschließenden Experiment wurden die gedruckten Kanäle an eine Peristaltikpumpe angeschlossen und gezeigt, dass die Kanäle durchspülbar sind. Insgesamt zeigte sich in vielen Analysen ein Vorteil von GelNB/GelS gegenüber GelMA. Insbesondere die höhere Biokompatibilität und Stabilität der GelNB/GelS Gele *Medium* und *High* gegenüber GelMA8.0 und GelMA *High* deuteten darauf hin, dass sich diese neuartigen Gele gut für den Aufbau von Gewebemodellen eignen. Die mit dem extrusionsbasierten 3D Biodruck erzeugten Strukturen sind vergleichsweise groß. Um Strukturen im Mikro- und Nanometerbereich zu erzeugen, sind Verfahren notwendig, die auf präziseren Technologien beruhen. In den letzten Jahren haben sich besonders die laserbasierten Lithografiemethoden als geeignet für den Aufbau von nanoskaligen Strukturen aus unterschiedlichsten Materialien erwiesen.^{46,76}

3.5.7 Direct Laser Writing

Beim DLW handelt es sich um eine Form der Multiphotonen-Lithografie.³⁶ Mit einem fokussierten Laser werden dabei hochpräzise Strukturen in ein Material, den Photolack, geschrieben. Auf diese Weise können sehr feingliedrige Strukturen jeglicher Geometrie erzeugt werden.^{36,65} Im Gegensatz zu den durch extrusionsbasierten 3D Biodruck erhaltenen Strukturen sind die mit DLW erzeugten Strukturen um ein Vielfaches kleiner. Für einen erfolgreichen Schreibvorgang müssen im Photolack ausreichend viele photoreaktive Gruppen vorhanden sein. Da es sich um ein Multiphotonen-Verfahren handelt, muss der eingesetzte Photoinitiator in der Lage sein gleichzeitig zwei Photonen zu absorbieren.⁶³ Der biokompatible Photoinitiator LAP besitzt diese Eigenschaft. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich die Thiol-En Reaktion als Vernetzungsreaktion für DLW eignet, ebenso, dass sich Norbornen-funktionalisierte Gelatine mit Dithiothreitol (DTT) durch DLW zu filigranen Strukturen verarbeiten lässt.⁴⁶ Auch für den Biolack GelNB/GelS *High* konnten Van Hoorick *et al.* zeigen, dass sich Strukturen durch DLW erzeugen lassen.²¹⁸ In der Vergangenheit wurden mit DLW erzeugte Strukturen aus kommerziellen Photolacken oft als Stützstrukturen für die Besiedelung mit Zellen verwendet. Da die Zellen dabei undefiniert über das gesamte Substrat verteilt werden, wurden neben den Strukturen auch die Glassubstrate besiedelt. Um die Zellen an definierten Stellen der geschriebenen Strukturen zu fixieren, waren aufwendige Beschichtungs- und Multimaterialdruckvorgänge nötig.⁶⁷ Um dies zu umgehen sollen die Zellen zukünftig direkt in die Strukturen eingeschrieben werden. In Kollaboration mit Tobias Messer (Institut für angewandte Physik, KIT) wurde untersucht, ob GelNB/GelS *High* in Gegenwart von HepG2 zu definierten, stabilen Strukturen verschrieben werden kann.

3.5.7.1 Lackzusammensetzung

Da für die 2PA ein Photoinitiator in ausreichender Menge vorhanden sein muss, der in der Lage ist zwei Photonen simultan zu absorbieren, ist DLW für die Erzeugung von Strukturen in Gegenwart von Zellen nur bedingt geeignet.²¹⁹ Je nach Material werden hohe Anteile Photoinitiator (>0,5-1 %) benötigt. Damit die Erzeugung von Strukturen durch DLW in Kombination mit Zellen eingesetzt werden kann, musste zunächst die Lackzusammensetzung gefunden werden, die möglichst geringe Mengen Photoinitiator enthält. Der Photoinitiator ist in der Photopolymerlösung von GeINB/GeIS die Komponente mit der größten Toxizität, weshalb zunächst versucht wurde Schreibparameter zu finden, die es ermöglichen die Menge LAP zu reduzieren. Es wurden Biolacke aus GeINB/GeIS *High* in DPBS^{-/-} in einer Konzentration von 5 % angesetzt und mit unterschiedlichen Mengen LAP versetzt, sodass die LAP-Konzentration 1,7 %, 1,3 %, 1,0 %, 0,5 % und 0,3 % betrug. Vor jedem Schreibvorgang wurden 50 µl des Biolackes auf ein silanisiertes Deckglas gegeben und in den Probenhalter des Photonic Professional GT (nanoscribe GmbH) eingesetzt. Die Erzeugung der Strukturen erfolgte mit einem Laser der Wellenlänge 780 nm. In einem ersten Schritt wurden die Laserleistung bestimmt, die nötig war um eine Polymerisierung zu erreichen, und die zugehörige Schreibgeschwindigkeit, mit der stabile Strukturen erhalten wurden. In Abbildung 76A sind die untersuchten Laserleistungen und Schreibgeschwindigkeiten gezeigt. Neben dem Dosisstest und dem Block-Powertest wurden hohle Quader mit unterschiedlichen Parametern geschrieben um zu beurteilen, welche Parameter funktionieren. Abbildung 77B zeigt die Hellfeldaufnahmen der geschriebenen Quader.

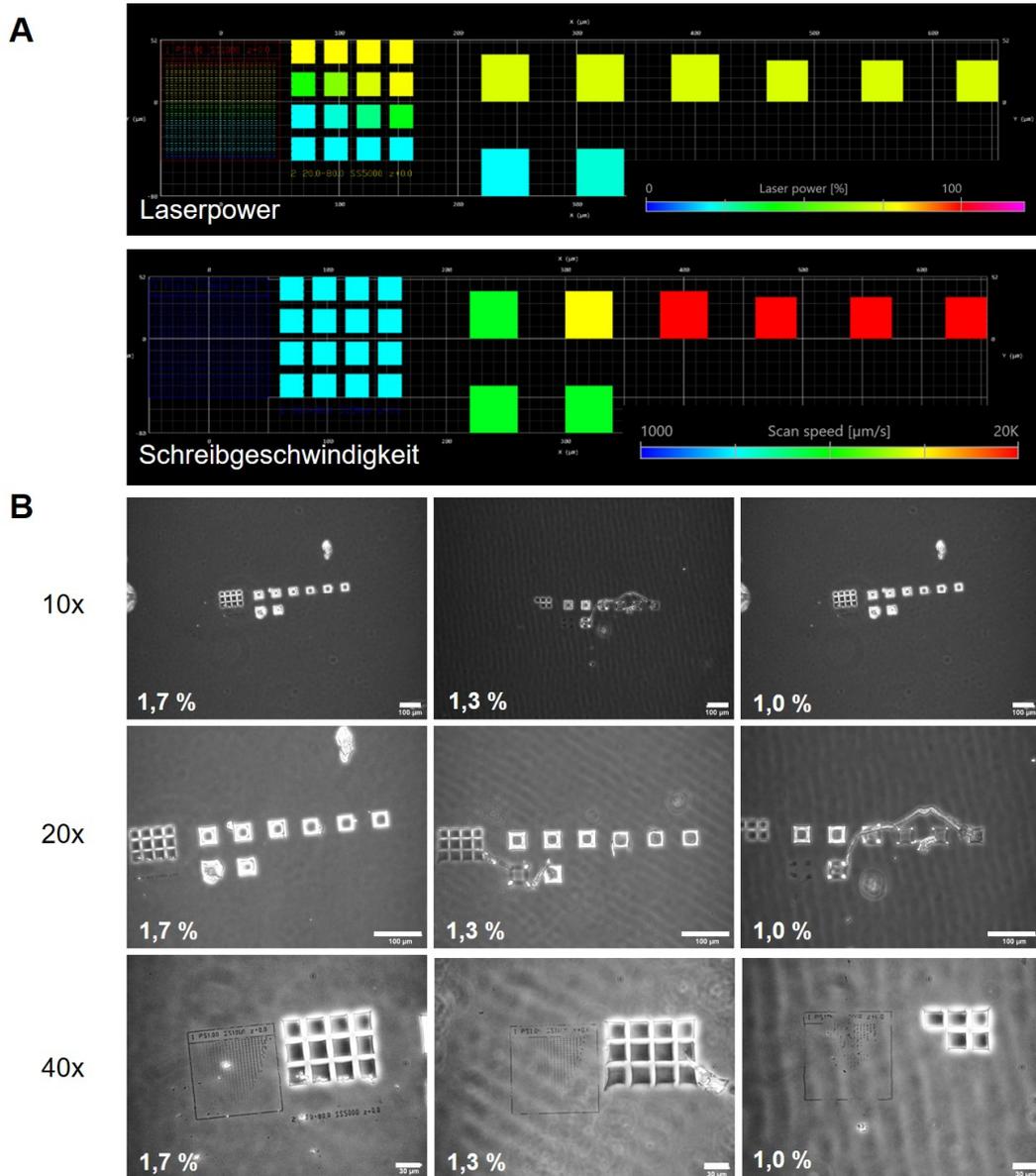


Abbildung 76: Direct Laser Writing mit GeINB/GeIS High. Um die verwendete Menge LAP zu reduzieren wurden hohle Quader mit verschiedenen Parametern geschrieben. (A) Untersuchte Parameter Laserpower und Schreibgeschwindigkeit, (B) Hellfeldaufnahmen der geschriebenen Strukturen mit unterschiedlichen Objektiven (10x, 20x, 40x). Maßstab 100 μm (10x, 20x), 30 μm (40x). In Kollaboration mit Tobias Messer (APH, KIT).

Die Aufnahme mit dem 10x Objektiv zeigt eine Übersicht der aus GeINB/GeIS High mit unterschiedlichen Konzentrationen LAP geschriebenen Strukturen. Um die Stabilität und Form der Strukturen unterschiedlicher Schreibparameter besser beurteilen zu können, wurden der Dosis- und Block-Power-Test mit dem 40x Objektiv und die hohlen Quader mit dem 20x Objektiv aufgenommen. Die Aufnahmen des Dosis- und Block-Power-Tests zeigen mit Abnahme der LAP-Konzentration eine zunehmende Verschlechterung der geschriebenen Linien und Blöcke. Für 1,0 % LAP war zu erkennen, dass nur Blöcke, die mit hoher Laserleistung geschrieben wurden zu definierten Strukturen führten. Betrachtet man die hohlen Quader (20x Objektiv), so fällt auf, dass nur das langsame Schreiben mit hohen Laserleistungen zu definierten, stabilen Strukturen aus GeINB/GeIS High mit 1,0 % LAP führte.

War mehr LAP im Lack vorhanden, so konnten auch stabile Strukturen mit schnellerer Geschwindigkeit und geringerer Laserleistung erreicht werden. Da eine Reduzierung des LAP-Gehaltes unabdingbar für eine hohe Biokompatibilität ist, wurde in Kauf genommen, dass die zu schreibenden Strukturen in Anwesenheit von Zellen mit hoher Laserpower und geringer Schreibgeschwindigkeit erzeugt werden müssen.

3.5.7.2 DLW in Gegenwart von HepG2

Um eine erste Beurteilung des in Kapitel 3.5.7.1 definierten Lacks im Hinblick auf die Biokompatibilität vorzunehmen, wurden Kontrollen aus GelNB/GelS *High* mit 1 % LAP und 5×10^6 HepG2/ml angesetzt. 200 μ l zellhaltige Photopolymerlösung (5 % GelNB/GelS *High*, 1 % LAP, 5×10^6 HepG2/ml) wurden in zwei Kavitäten eines 8-Well μ -slides gegeben und mit dem Omnicure S2000 ausgehärtet. Da während der Vorbereitung und des Schreibvorganges keine Zellkulturbedingungen vorhanden waren, wurden auch Kontrollen angefertigt, die nicht mit dem Laser in Kontakt kamen, jedoch den gleichen Umgebungsbedingungen wie die geschriebenen Strukturen ausgesetzt waren. An Tag 0 und Tag 7 wurde eine Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM (4 μ M) und PI (0,02 mg/ml) durchgeführt um die Viabilität der HepG2 zu analysieren. In Abbildung 77 sind die Ergebnisse der Visualisierung mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5) gezeigt. Für die Kontrolle unter Zellkulturbedingungen zeigte sich an T0 ein großer Anteil grün fluoreszierender Zellen, während für die Kontrolle unter Schreibbedingungen keine viablen Zellen mehr zu detektieren waren. An Tag 7 konnten auch in der Kontrolle unter Zellkulturbedingungen keine viablen HepG2 mehr detektiert werden. Wie erwartet, wirkte der hohe Anteil LAP von 1 % toxisch auf die enthaltenen Zellen. In den Tiefenfärbungen der Kontrollen ist zu erkennen, dass die Zellen zu allen Zeitpunkten dreidimensional im Gel verteilt waren.

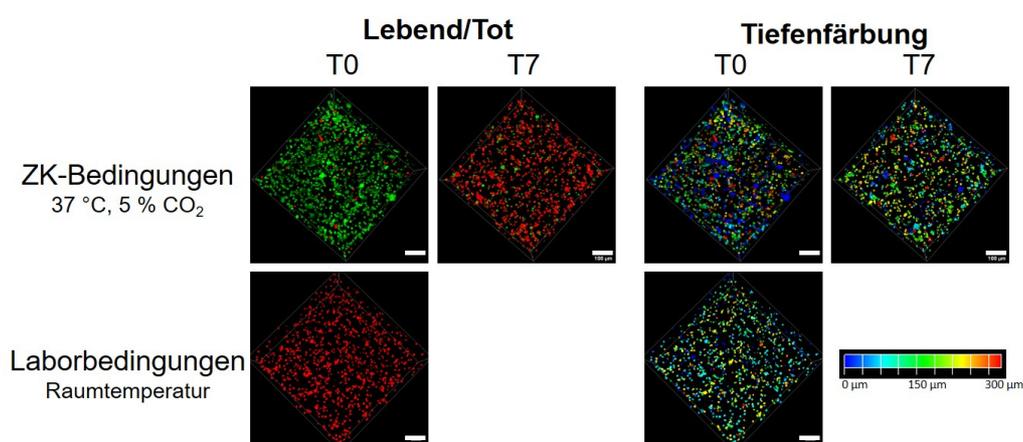


Abbildung 77: In GelNB/GelS *High* mit 1 % LAP eingekapselte HepG2. Es wurden Kontrollen unter Zellkulturbedingungen und unter Schreibbedingungen angefertigt. Die Färbung erfolgte mit Calcein-AM und PI und wurde mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie visualisiert (Leica Stellaris 5, 10x Objektiv, Zoom 1,0, Z-Stack Höhe 300 μ m, Schrittgröße 5 μ m, Schrittgröße 5 μ m, grün: Ex.: 494 nm, Em.: 499-544 nm, rot: Ex.: 549 nm, Em.: 591-725 nm). Die Rekonstruktion der Z-Stacks erfolgte mit der Software LasX (Leica), ebenso die Erstellung der Tiefenfärbung (blau 0 μ m, rot 300 μ m). Maßstab 100 μ m.

Trotz der hohen Toxizität des Lackes wurden Strukturen aus zellbeladenem Photolack geschrieben. Als Struktur wurde hierfür ein poröser Würfel ausgewählt. Dadurch konnte gleichzeitig ein erster Eindruck über die Stabilität des Photolackes im Hinblick auf feingliedrige Strukturen gewonnen werden. Ein 3D Modell dieser Struktur ist in Abbildung 78A dargestellt. Um die Strukturen unter dem Fluoreszenzmikroskop zu visualisieren wurde der Farbstoff Atto647N dem Lack beigemischt. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich der Farbstoff ohne Auswirkungen in die Struktur einbauen lässt, zudem ist er wasserlöslich und biokompatibel.²²⁰ Abbildung 78B zeigt die Visualisierung der Strukturen mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie. Die geschriebenen Strukturen wiesen alle gewünschten Hohlräume auf, es war kein Kollabieren der Streben zu erkennen. Die Kantenlänge des Würfels betrug 100 µm, die Höhe 50 µm und die Dicke der Streben je 5 µm. Im zweiten Schritt wurden poröse Würfel aus zellhaltigem GelNB/GelS *High* geschrieben. Hierzu wurde der Lack vor jedem Schreibvorgang frisch angesetzt, um ein unnötiges Inkubieren der Zellen im Lack zu vermeiden. Es wurde mit einer Konzentration von 5×10^6 HepG2/ml im Lack begonnen. Mit einer Laserpower von 80 % und einer Schreibgeschwindigkeit von 10000 µm/s wurden die Würfel in den zellhaltigen Lack geschrieben. Da die hohe Zahl HepG2 die Transparenz des Lackes beeinflusste, musste die Zellzahl für einen erfolgreichen Schreibvorgang auf 1×10^6 HepG2/ml reduziert werden. Die Entwicklung der Strukturen erfolgte bei 37 °C für 20 min in DPBS^{-/-}. Zur Visualisierung und Beurteilung der Viabilität der HepG2 in den geschriebenen Strukturen wurde eine Lebend-Tot-Färbung durchgeführt. Die Visualisierung ist in Abbildung 78C (Fluoreszenzmikroskopie, Leica DMIL) und Abbildung 78D (konfokale Fluoreszenzmikroskopie, Leica Stellaris 5) gezeigt. Bereits in der Hellfeldaufnahme war festzustellen, dass sich die Zellen nicht in einer dreidimensionalen Anordnung befanden. Bei Anregung der Fluoreszenz waren keine grün fluoreszierenden Zellen detektierbar. Das gleiche Ergebnis lieferte auch die konfokale Visualisierung. Es waren weder in den Würfeln noch darum viable Zellen detektierbar. Die Tiefenfärbung bestätigte den Eindruck aus der Fluoreszenzmikroskopie, dass die Zellen nicht dreidimensional verteilt waren. Die Tatsache, dass sich die Zellen alle in einer Ebene befanden ist darauf zurückzuführen, dass diese während des Schreibvorganges von etwa 8 min sedimentieren und sich auf dem Deckglas sammeln. Um dies zu umgehen, kann die Viskosität des Lackes durch Abkühlen unter Raumtemperatur erhöht werden oder die Konzentration des Hydrogels erhöht werden. Dies wurde in dieser Arbeit nicht mehr überprüft.

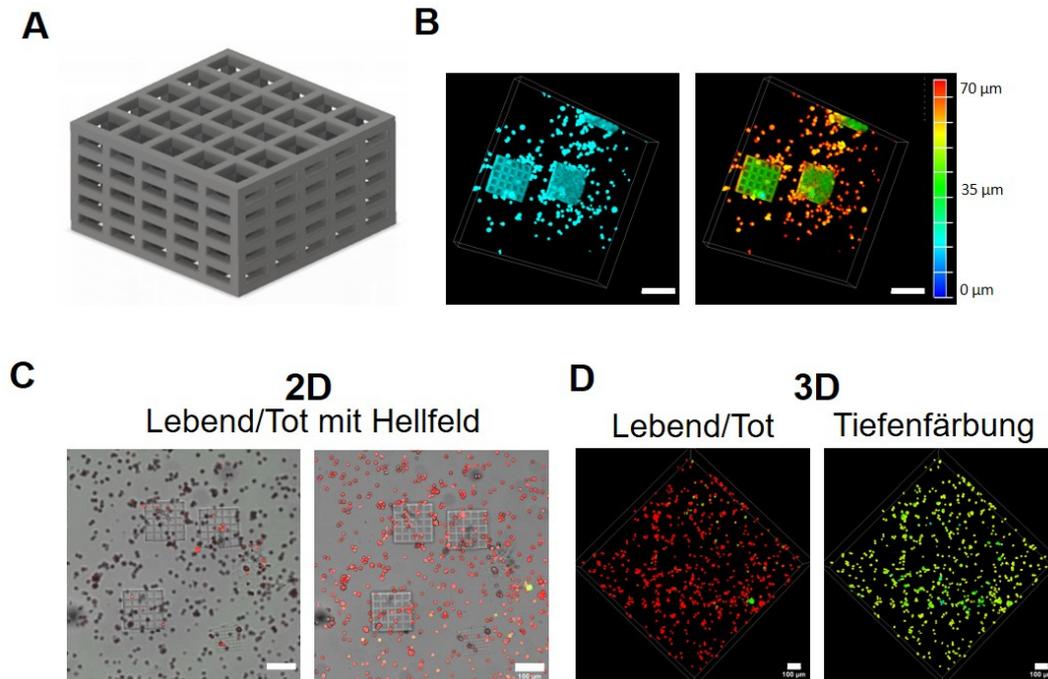


Abbildung 78: DLW mit GelNB/GelS High. (A) Modell der geschriebenen Struktur, (B) konfokale Fluoreszenzmikroskopie der geschriebenen Strukturen, (C) Hellfeldaufnahmen der geschriebenen Strukturen, (D) Lebend-Tot-Färbung von HepG2 nach dem Schreibvorgang. Maßstab 100 µm. In Kollaboration mit Tobias Messer und Tobias Göckler.

Als Nachteil des DLW zeigte sich auch die Größe der Strukturen. Eukaryotische Zellen weisen typischerweise Größen zwischen 10 und 100 µm auf.²²¹ Die verwendeten HepG2 waren mit einem Durchmesser von wenigen Mikrometern den kleineren Zellen zuzuordnen. Verglichen mit der Größe der Strukturen, die mit DLW erzeugt werden können, sind Zellen also recht groß. Um Zellen in eine Struktur einzukapseln zu können, muss die Struktur deutlich größer sein als die Zellen. Dies kann mit DLW erreicht werden, allerdings verlängert sich durch Zunahme der Größe auch der Schreibvorgang. Für den Aufbau von vollständigen Geweben aus unterschiedlichen Zelltypen ist DLW noch nicht geeignet, da Zellen nicht an einer definierten Stelle fixiert werden können und die Schreibvorgänge von größeren, biologisch relevanten Strukturen zu lange Zeiten in Anspruch nehmen würden. Die Erzeugung von sehr kleinen Teilstrukturen könnte jedoch zukünftig von Interesse für das *Tissue Engineering* sein.⁴⁶

Durch Optimierung des Schreibvorganges hinsichtlich der Umgebungsbedingung und der Geschwindigkeit kann DLW in Zukunft in Gegenwart von Zellen möglich sein. Möglicherweise lassen sich auch durch die Entwicklung neuer Photoinitiatoren die Toxizität der Lacke senken, sodass verschiedene Zellen erfolgreich zu definierten, präzisen Strukturen in einem biokompatiblen Photolack angeordnet werden können. Besonders in der Kombination mit anderen 3D Biodruck Technologien könnte sich das DLW als hilfreich erweisen, da dies ermöglicht besonders kleine Strukturen zu erzeugen.

3.6 Zusammenfassung Teil I – Hydrogele ohne Vernetzer

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die ohne Vernetzer lichtinduziert polymerisierbaren Photopolymere GelMA und GelNB/GelS hinsichtlich ihrer Eignung für den Einsatz im *Tissue Engineering* charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass sich die Photopolymere in unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden durch wässrige Synthesen einfach herstellen lassen. Vor dem Einsatz in der Zellkultur wurde untersucht, welche Auswirkungen das verwendete Aushärtungssystem auf Zellen hat und ob sich die Photopolymerlösungen durch Autoklavieren sterilisieren lassen. Es zeigte sich, dass das eingesetzte Aushärtungssystem Omnicure S2000 keine negativen Auswirkungen auf die Viabilität der bestrahlten Zellen hat. Als weniger erfolgreich zeigte sich das Autoklavieren der Photopolymerlösungen. Die Photopolymere GelMA1.0 und GelNB/GelS *Low* ließen sich nicht mehr polymerisieren, zusätzlich zeigten sich erhebliche Veränderungen in den viskoelastischen Eigenschaften und der Geliertemperatur. Sowohl die Speichermodule G' als auch die Geliertemperatur sanken signifikant ab gegenüber den nicht autoklavierten Proben. Nach Bestimmung der Polymerisationsbedingungen erfolgte eine toxikologische Charakterisierung der Abbauprodukte der verschiedenen Hydrogele. Es zeigte sich eine etwas geringere Toxizität für die Abbauprodukte von GelNB/GelS. Im weiteren Verlauf wurden Fibroblasten in die einzelnen Hydrogele eingebettet und deren Verhalten im Hinblick auf Viabilität, Elongation und Bildung von Zell-Zell-Kontakten beurteilt. Es konnte hier keine definierte Zellzahl erkannt werden, die zu einer schnelleren Elongation oder Bildung von Zell-Zell-Kontakten führte. Es wurde jedoch festgestellt, dass sich die Zellzahl individuell an das Experiment, das durchgeführt werden soll, ohne Viabilitätsverluste anpassen lässt. Für eine Kultivierung länger als 21 Tage eigneten sich alle Hydrogele bis auf GelMA1.0, es konnte jedoch ein Vorteil der GelNB/GelS Hydrogele hinsichtlich Stabilität und Viabilität detektiert werden. Auch in der Versorgung großer Strukturen zeigten sich GelMA und GelNB/GelS als geeignet. Abschließend wurden die Hydrogele GelMA und GelNB/GelS im 3D Biodruck als Biotinten mit und ohne Zellen eingesetzt. Am Biodrucker BioSpot BP konnten Druckparameter bestimmt werden, die es ermöglichten unterschiedlichste Strukturen zu drucken. Es wurde erfolgreich ein BBB-Modell auf einem PC-Substrat aufgebaut und über 7 Tage fluidisch kultiviert. Auch der Aufbau von Kanalstrukturen aus Hydrogel und Gelatine wurde erfolgreich durchgeführt. Es konnten zellhaltige Hohlraumstrukturen gedruckt werden, die durch Entwicklung des MX-Systems an eine Pumpe angeschlossen werden konnten. Als zweite 3D Biodruck-Technologie wurde *DLW* untersucht. Mit GelNB/GelS *High* konnten erfolgreich poröse Würfelstrukturen geschrieben werden. Auch mit zellhaltigem Photolack konnten Strukturen erzeugt werden. Auf Grund des hohen Anteils LAP im Lack konnten jedoch keine viablen Zellen in den Strukturen detektiert werden.

4 Ergebnisse II – Hydrogele mit Vernetzer

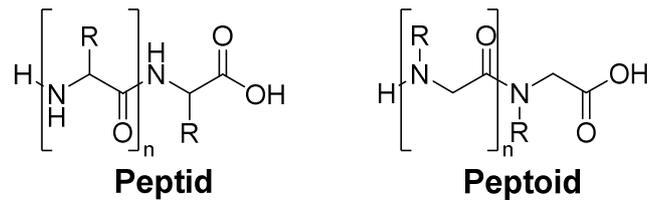
Neben den Hydrogelen ohne Vernetzer, GelMA und GelNB/GelS, wurde in Zusammenarbeit mit den Masterstudenten Dominik Feser, Sonja Leopold und Johanna Wien ein weiteres Hydrogelsystem entwickelt, das auf GelS als natürlicher Komponente basierte.²²²⁻²²⁴ Der Einsatz von einfach synthetisierbaren Vernetzern bietet die Möglichkeit zusätzliche funktionelle Gruppen und Moleküle in die Gele einzubringen. Im Hinblick auf das Einbringen von zum Beispiel Wachstumsfaktoren oder Signalstoffen könnte sich dies als entscheidender Vorteil herausstellen. Als Vernetzer wurde der bereits etablierte Vernetzer Polyethylenglykoldiacrylat (PEGDA) und verschiedene Peptide eingesetzt. Die erhaltenen Hydrogele wurden in dieser Arbeit umfassend charakterisiert und ihre Eignung für den Einsatz im *Tissue Engineering* evaluiert. Hierfür wurden zunächst die Aushärtungsbedingungen der Gele bestimmt und die Vernetzer toxikologisch untersucht. Es erfolgte eine umfassende Charakterisierung der Vernetzung, des Quell- und Degradationsverhaltens und des Speichermoduls. Zur Evaluierung der Biokompatibilität wurden Zellen in die Gele eingebettet und die Viabilität und Proliferation beurteilt. Abschließend wurde das Gel GelS/P1 im extrusionsbasierten 3D Biodruck eingesetzt.

4.1 Gelatine-basiertes Rückgrat GelS

Tobias Göckler konnte zeigen, dass sich die GelNB/GelS Hydrogele an den überschüssigen funktionellen Gruppen weiter funktionalisieren lassen.¹⁵⁷ Um auf überschüssige funktionelle Gruppen an den Gelatineketten verzichten zu können und trotzdem zusätzliche Moleküle in die Gele einbringen zu können, können Vernetzer verwendet werden, die bereits mit den gewünschten Molekülen funktionalisiert sind oder eine funktionelle Gruppe tragen, die nicht am Vernetzungsvorgang beteiligt ist. Diese Gruppe kann nach dem Vernetzen der Hydrogele genutzt werden, um bestimmte Moleküle einzubringen. Die aus Kapitel 3.1.4 bekannte thiolierter Gelatine GelS *Medium* diente in diesem Teil der Arbeit als Basis der Hydrogele. Anstatt mit GelNB wurde GelS *Medium* mit PEGDA und verschiedenen Peptiden zum Hydrogel vernetzt. Es sollte in dieser Arbeit evaluiert werden, ob sich Peptide im Allgemeinen als Alternative zu PEGDA eignen.

4.2 Synthese und Charakterisierung der Vernetzer

Die Auswahl von Peptiden als Vernetzer für thiolierter Gelatine beruhte auf der Proteasestabilität und der bekannten Biokompatibilität von Peptiden.²²⁵ Peptide als Peptidomimetika sind vor allem als molekulare Transporter für organspezifischen Wirkstofftransport und als Wirkstoffe selbst in den Fokus der Forschung gerückt.²²⁶⁻²²⁸ Peptide unterscheiden sich von Peptiden dahingehend, dass sich die Seitenkette nicht am α -Kohlenstoff sondern am Stickstoff befindet. Die Strukturformeln von Peptiden und Peptiden sind in Schema 9 gezeigt.

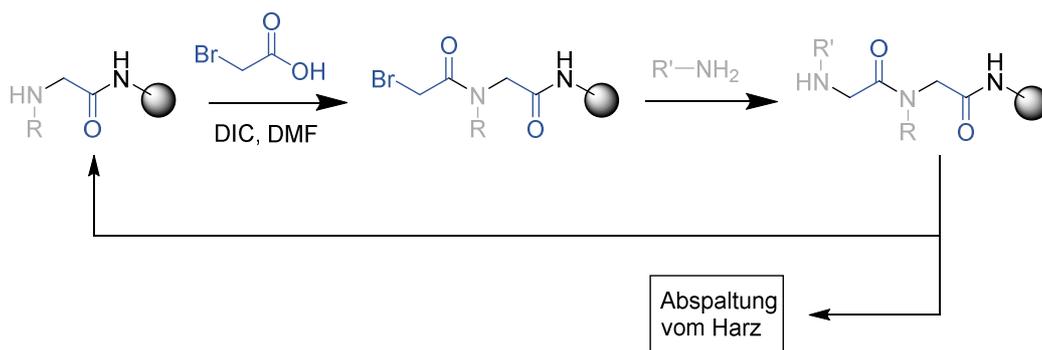


Schema 9: Strukturformel von Peptiden und Peptoiden. Die Seitenkette ist bei dem Peptoid am Stickstoff und nicht am α -Kohlenstoff substituiert.

Die einfache Synthese von Peptoiden, die flexibel an unterschiedliche Anforderungen angepasst werden kann macht sie auch als Vernetzer interessant. Zusätzlich sind sie, abhängig von ihrer Sequenz, gut wasserlöslich und wenig toxisch.²²⁹

4.2.1 Peptoidsynthese mit der Submonomermethode

R. Zuckerman entwickelte 1992, basierend auf der Peptidsynthese nach R. Merrifield, eine Synthesemethode mit welcher Peptide aus kommerziell erhältlichen Aminen an der festen Phase aufgebaut werden können. Die sogenannte Submonomermethode besteht aus der abwechselnden Acylierung einer Aminogruppe und einer anschließenden Aminkupplung (Schema 10).²³⁰

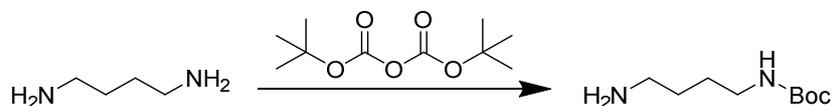


Schema 10: Submonomermethode zur Synthese von Peptoiden nach R. Zuckerman. An der festen Phase wird durch abwechselnde Acylierung und nucleophile Substitution mit einem Amin das Peptoid aufgebaut. Nach Erreichen der gewünschten Länge wird das Produkt von der festen Phase abgespalten.²³¹

Im ersten Schritt wird die an die feste Phase gebundene freie Aminogruppe mit Bromessigsäure acyliert. Im zweiten Schritt erfolgte die Kupplung eines primärenamins durch eine S_{N}^2 -Reaktion. Die Schritte werden abwechselnd bis zum Erreichen der gewünschten Länge des Peptoids wiederholt. Auf den Einsatz von Schutzgruppen kann weitestgehend verzichtet werden, da die Reaktion, im Gegensatz zur Peptidkupplung, nur in eine Richtung ablaufen kann.²³⁰ Eine Schützung ist jedoch bei der Verwendung von Diaminen als Submonomere nötig. Um diese als Seitenkette einzubauen muss die zweite Aminogruppe geschützt werden, damit die weitere Reaktion am Rückgrat und nicht an der Seitenkette verläuft. Da die Peptoide von der festen Phase sauer abgespalten werden, wurde die Boc-Schutzgruppe verwendet. Dadurch erfolgte die Entschützung der Seitenketten simultan zur Abspaltung des Produktes von der festen Phase.

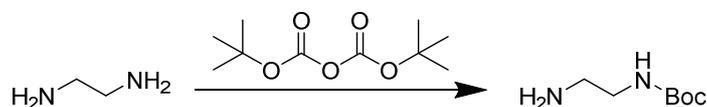
4.2.1.1 Boc-Schützung von *N*-1,4-Diaminobutan und Ethylendiamin

Die Schützung von *N*-1,4-Diaminobutan mit der Boc-Schutzgruppe erfolgte mit Di-*tert*-butyldicarbonat (Boc_2O). Zu einer Lösung von *N*-1,4-Diaminobutan in Tetrahydrofuran (THF) wurde Boc_2O getropft und über Nacht gerührt. Die Reaktion ist in Schema 11 gezeigt.



Schema 11: Boc-Schützung von *N*-1,4-Diaminobutan. Zu in THF (240 ml) gelöstem *N*-1,4-Diaminobutan (6,67 Äq., 400,2 mmol, 35,82 g, 40,1 ml) wurde Boc_2O (1,00 Äq., 60,0 mmol, 13,1 g) in THF (135 ml) getropft und die Lösung über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in eiskaltem Wasser gelöst und der unlösliche Feststoff abfiltriert. Das Produkt wurde mit EE extrahiert, die organische Phase mit Wasser und NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Abschließend wurde der EE unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt als gelbliche, viskose Flüssigkeit erhalten.

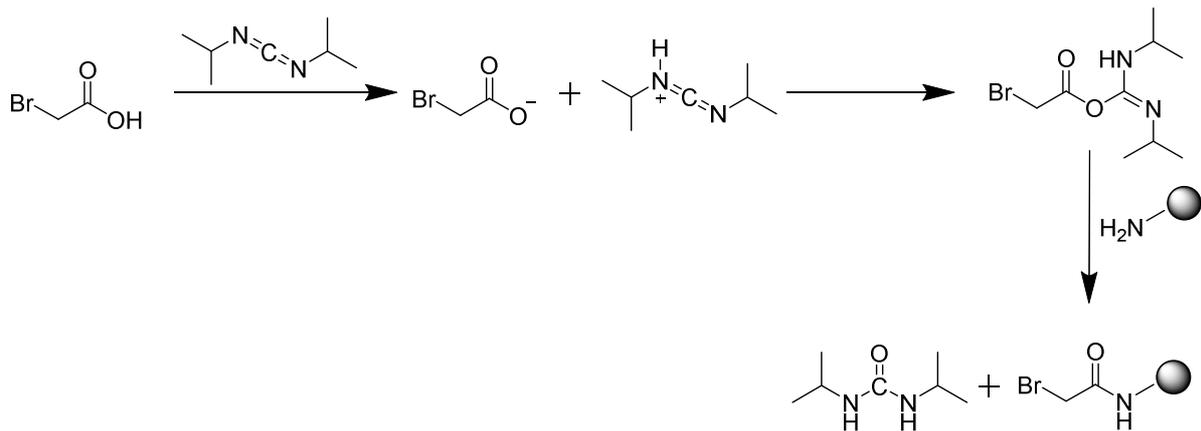
Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in eiskaltem Wasser gelöst. Der Feststoff wurde abgetrennt und das Produkt wurde mit Essigsäureethylester (EE) extrahiert um überschüssiges Diamin und die Nebenprodukte zu entfernen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde *N*-Boc-1,4-Diaminobutan als gelbliche viskose Flüssigkeit erhalten. Das zweite verwendete Diamin Ethylendiamin wurde analog mit der Boc-Schutzgruppe versehen. Das Reaktionsschema ist in Schema 12 gezeigt.



Schema 12: Boc-Schützung von Ethylendiamin. 26,7 ml Ethylendiamin (6,67 Äq., 400,2 mmol, 24,04 g) wurden in 240 ml THF gelöst und langsam 13,1 g Boc_2O (1,00 Äq., 60,0 mmol) in 135 ml THF zugetropft. Die Lösung wurde über Nacht gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in eiskaltem Wasser gelöst und der unlösliche Feststoff abgetrennt. Das Produkt wurde mit EE extrahiert, die organische Phase mit Wasser und NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Abschließend wurde der EE unter vermindertem Druck entfernt.

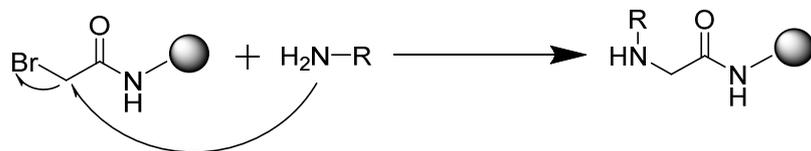
4.2.1.2 Peptidsynthese

Die Synthese erfolgte nach der oben beschriebenen Submonomermethode. Als feste Phase diente ein Fmoc-geschütztes Rink-Amid-Harz mit einer Beladungsdichte von 0,36 mmol/g. Je 300 mg des Harzes wurden über Nacht in 2,5 ml Dimethylformamid (DMF) quellen gelassen und das DMF anschließend entfernt. Die Entschützung erfolgte mit 20 % Piperidin in DMF. Vor der Kupplung des ersten Amines wurde die freie Aminogruppe mit Bromessigsäure acyliert. Die Reaktion ist in Schema 13 gezeigt. Die Carboxylgruppe der Bromessigsäure wurde mit Diisopropylcarbodiimid (DIC) aktiviert und so zur Reaktion mit der freien Aminogruppe gebracht.



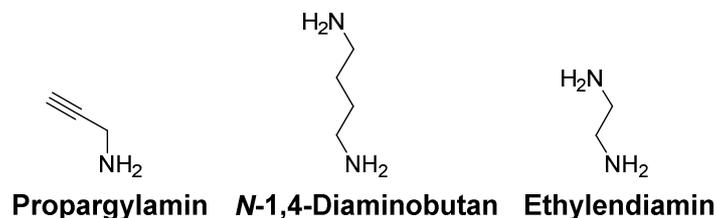
Schema 13: Acylierung der freien Aminogruppen an der festen Phase mit Bromessigsäure. Die Carboxylgruppe wurde mit DIC aktiviert. Modifiziert nach Feser.²²²

Die darauffolgende Kupplung des Amins erfolgte durch eine nucleophile Substitution (S_N^2) an das Bromacetamid (Schema 14).



Schema 14: Nucleophile Substitutionsreaktion (S_N^2) des Amins an das Bromacetamid. Modifiziert nach Leopold.²²³

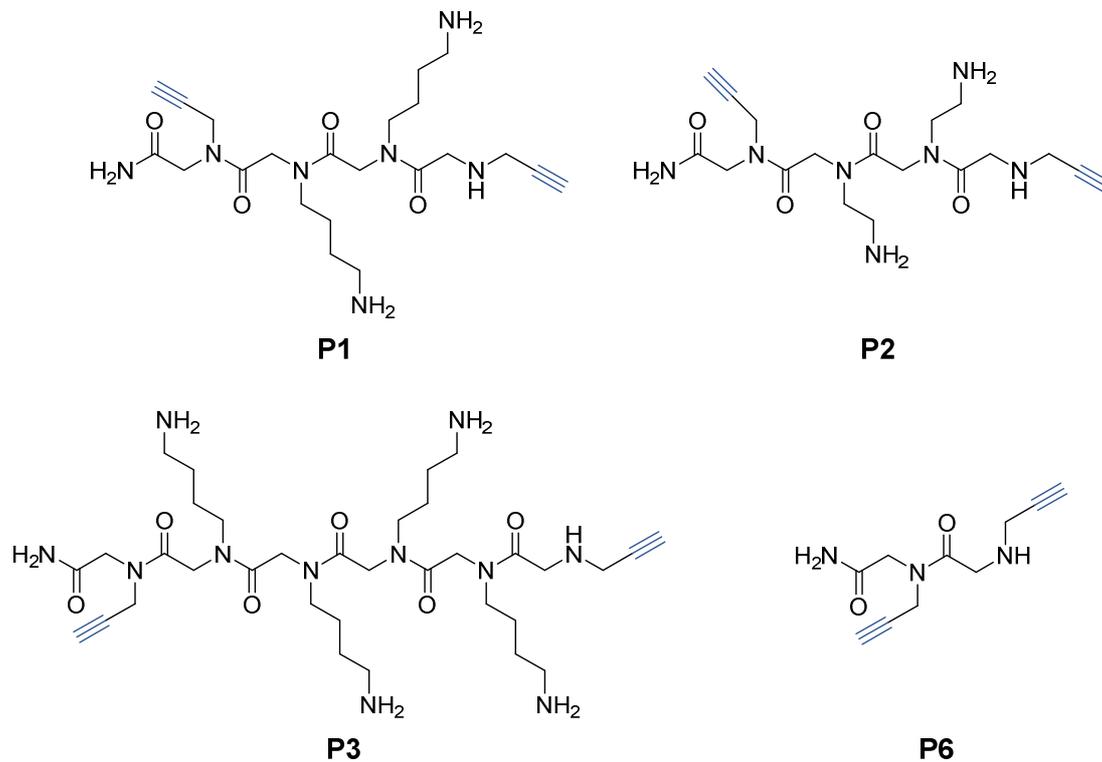
Die beiden Reaktionsschritte wurden abwechselnd wiederholt, bis die gewünschte Länge des Peptoids erreicht war. Für die Vernetzung von GeIS *Medium* wurden Vernetzer benötigt, die über zwei Doppel- oder Dreifachbindungen verfügen, da als Vernetzungsreaktion erneut die Thiol-En beziehungsweise Thiol-In-Reaktion dienen sollte. Da für die Synthese von Peptoiden bekannt ist, dass sich Propargylamin gut einbauen lässt, wurde dies zum Einbau der Dreifachbindung gewählt. Um die Wasserlöslichkeit der Vernetzer zu gewährleisten, wurden als weitere Monomere Amine mit einer zweiten Aminogruppe gewählt. *N*-1,4-Diaminobutan gleicht nach dem Einbau der Aminosäureseitenkette von Lysin, Ethylendiamin diene als kürzerer Vertreter der Diamine. In Schema 15 sind die Strukturformeln der verwendeten Amine Propargylamin, Boc-Diaminobutan und Boc-Ethylendiamin gezeigt.



Schema 15: Strukturformel der Aminmonomere Propargylamin, Boc-Diaminobutan, Boc-Ethylendiamin.

Um zu verhindern, dass die Elongation des Peptoids an einer Seitenkette abläuft wurden *N*-1,4-Diaminobutan und Ethylendiamin mit der Boc-Schutzgruppe versehen (Kapitel 4.2.1.1).

Aus den Monomeren wurden vier unterschiedliche Peptide synthetisiert. Diese sind in Schema 16 gezeigt.



Schema 16: Strukturformeln der als Vernetzer synthetisierten Peptide.

An der ersten und letzten Position aller Peptide wurde eine Dreifachbindung durch Propargylamin eingebaut, sodass lineare Vernetzer für GeIS erhalten wurden. Die einzelnen Peptide unterschieden sich zum einen in der Länge (P1 und P2 Tetramer, P3 Hexamer, P6 Dimer) und in ihrer Zusammensetzung. P1 und P2 unterschieden sich nur in ihren Seitenketten. Somit unterschieden sich die Peptide sowohl in ihrer Länge, wodurch sich die Porengröße im vernetzten Hydrogel unterscheiden sollte, als auch in ihren Seitenketten, was die Biokompatibilität beeinflussen könnte.^{229,232} Nach erfolgter Elongation wurden die Peptide unter sauren Bedingungen abgespalten, wodurch auch die Entschützung der Seitenketten stattfand. Nach der Abspaltung wurden die Peptide getrocknet und mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) gereinigt. Die erfolgreiche Synthese wurde mit Massenspektrometrie bestätigt.

4.2.2 Charakterisierung der Vernetzer und Hydrogele

In Kooperation mit der Masterstudentin Sonja Leopold wurden die synthetisierten Peptide und PEGDA zunächst toxikologisch untersucht, anschließend wurden die optimalen Aushärtungsbedingungen bestimmt.²²³ Die erhaltenen Hydrogele wurden dann umfassend charakterisiert.

4.2.2.1 Toxikologische Untersuchung der Vernetzer

Um eine erste Einschätzung zu erhalten, ob sich Peptoide überhaupt für den Einsatz in Gegenwart von Zellen in hohen Konzentrationen eignen wurde die Toxizität der einzelnen Peptoide und dem Vergleichsvernetzer PEGDA untersucht. Zur Bestimmung der Viabilitäten nach der Exposition mit den Vernetzern wurden MTT-Assay durchgeführt. Hierzu wurden 1×10^4 HepG2 pro Well in DMEM in einer 96-Well Platte ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden wurde in den Kontrollen das Medium gewechselt und die HepG2 mit den unterschiedlichen Vernetzern in verschiedenen Konzentrationen (10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1 mM, 3 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM) behandelt. Die Toxizität wurde für unterschiedliche Expositionszeiten (10 Min, 3 Stunden, 72 Stunden) analysiert. Nach Ablauf der Expositionszeit wurde die Peptoidlösung abgenommen, die Zellschicht mit DPBS⁻ gewaschen und frisches DMEM zugegeben. Die Zellen wurden weiter inkubiert, sodass die MTT-Zugabe 72 Stunden nach der Zugabe der Peptoidlösung erfolgte. Die Ergebnisse der MTT-Assays sind in Abbildung 79 gezeigt. Die Bestimmung der Viabilität erfolgte als *test-over-control* in Triplikaten. Abbildung 79A zeigt die erhaltenen Viabilitäten für eine Expositionszeit von 10 min. Für die kurze Expositionszeit zeigten die Vernetzer mit Ausnahme von PEGDA auch in höheren Konzentrationen keine Toxizität auf die Zellen. Die $LD_{50/10min}$ lag für die untersuchten Peptoide über 10 mM. Aus den erhaltenen Daten konnte für PEGDA eine $LD_{50/10min}$ von 400 μ M ermittelt werden. In Abbildung 79B sind die ermittelten Viabilitäten nach 3 stündiger Exposition gezeigt. Die $LD_{50/3h}$ für PEGDA sank auf 50 μ M. Für P2 konnte eine $LD_{50/3h}$ von 4,5 mM ermittelt werden, alle anderen Peptoide zeigten keine erhöhte Toxizität ($LD_{50/3h} > 10$ mM). Nach 72 Stunden Exposition mit den Vernetzern sank die $LD_{50/72h}$ von PEGDA auf 32 μ M. Auch die Toxizität von P3 erhöhte sich, es konnte eine $LD_{50/72h}$ von 5,5 mM ermittelt werden. Für P2 wurde eine $LD_{50/72h}$ 2 mM ermittelt. P1 und P6 führten nicht zu Viabilitäten unter 50 % weshalb eine $LD_{50/72h}$ von über 10 mM ermittelt wurde.

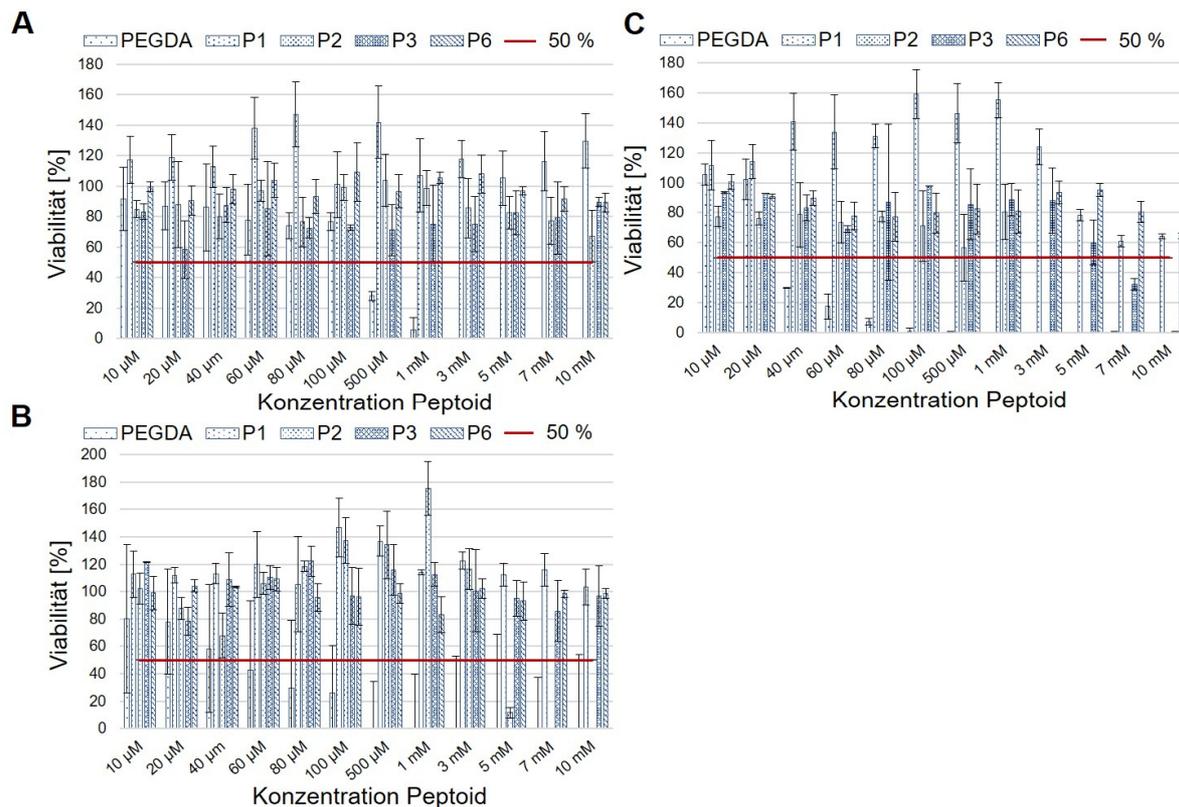


Abbildung 79: Durch den MTT-Assay ermittelte Viabilitäten von mit den Vernetzern behandelten HepG2 nach verschiedenen Inkubationszeiten. Die HepG2 wurden für 10 Minuten, 3 Stunden und 72 Stunden mit den Peptoiden in verschiedenen Konzentrationen (10 µM, 20 µM, 40 µM, 60 µM, 80 µM, 100 µM, 500 µM, 1 mM, 3 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM) behandelt und anschließend mit dem MTT-Assay die Viabilität als test-over-control. Der Mittelwert wurde mit $n=3$ berechnet, die Standardabweichung mit $n-1$. (A) 10 min, (B) 3 Stunden, (C) 72 Stunden.

Die Ergebnisse des MTT-Assays zeigten, dass die Peptide als biokompatible Vernetzer eingesetzt werden können, da auch höhere Konzentrationen erst nach langer Expositionszeit von mehr als 3 Stunden zur $LD_{50/3h} < 4,5-10$ mM führten. Zusätzlich sind die Ergebnisse aus dem 2D Assay nur bedingt auf 3D angeordnete Zellen übertragbar, da sich das Verhalten und die Funktion von Zellen abhängig von ihrer Anordnung unterscheidet. Um aus GeIS mit Vernetzern ein Hydrogel zu erhalten, muss die Lösung mit einem Photoinitiator versetzt und die Vernetzungsreaktion mit Licht induziert werden. Um die Aushärtungsbedingungen festzulegen, wurden unterschiedliche Parameter getestet.

4.2.2.2 Bestimmung der Aushärtungsbedingungen

Die die Polymerisationszeit beeinflussenden Parameter Vernetzerkonzentration, Photoinitiatorkonzentration und Strahlungsintensität wurden für die verschiedenen Vernetzer variiert und unter Berücksichtigung der Toxizität die Polymerisationsbedingungen festgelegt. Da in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass sich eine Gel-Konzentration von 5 % gut für den Einsatz im *Tissue Engineering* eignet, wurden Hydrogele mit 5 % GelS hergestellt. Hierzu wurde eine Stammlösung angesetzt, die mit Vernetzer, LAP und DPBS^{-/-} auf 5 % verdünnt wurde. Die genaue Zusammensetzung ist in Kapitel 6.10.1 gezeigt. In Abbildung 80 sind die gemessenen Polymerisationszeiten für variierte Vernetzerkonzentrationen (7 mM, 6,5 mM, 6 mM, 5,5 mM, 5 mM, 4,5 mM, 4 mM, 3,5 mM) gezeigt. Als geringste Vernetzerkonzentration wurde 3,5 mM gewählt, da dadurch gewährleistet wurde, dass für jedes Thiol eine Dreifachbindung vorhanden war. Die Polymerisation erfolgte mit 0,3 % LAP und 500 mW/cm². Für alle Vernetzer konnten steigende Polymerisationszeiten mit Abnahme der Konzentration detektiert werden, lediglich P1 zeigte keine Zunahme der Zeit. Da sich die Toxizität mit Zunahme der Konzentration des jeweiligen Vernetzers erhöhte, sollte die Konzentration des Vernetzers in der Hydrogelvorläuferlösung möglichst gering sein um auch längere Verarbeitungszeiten zu ermöglichen.

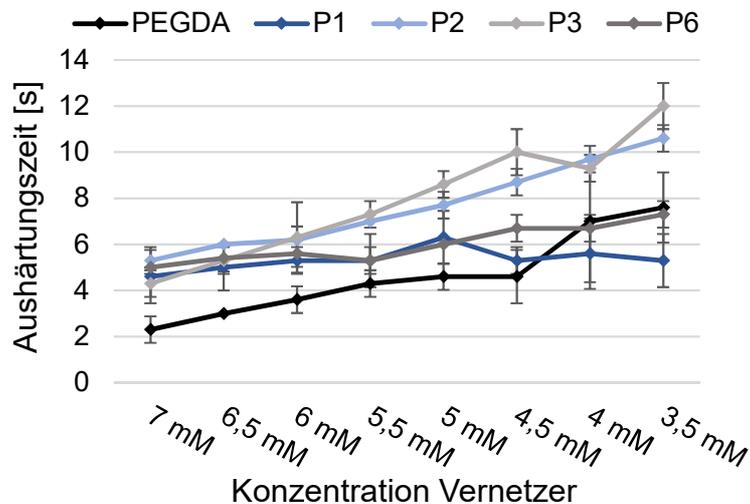


Abbildung 80: Zur Bestimmung der optimalen Aushärtungsbedingungen der Hydrogele mit Vernetzer wurden unterschiedliche Vernetzerkonzentrationen von 3,5 bis 7 mM untersucht. Je 50 μ L der jeweiligen Lösung (5 % GelS, 3,5-7 mM Vernetzer, 0,3 % LAP) wurden auf einen Objektträger gegeben und mit dem Omnicure S2000 (500 mW/cm²) bestrahlt. Die Zeit bis zur optisch erkennbaren Polymerisierung wurde gestoppt. Mit abnehmender Vernetzerkonzentration stieg die zur Polymerisierung benötigte Zeit an. Die Bestimmung erfolgte als Triplikat.

Insgesamt unterschieden sich die Polymerisationszeiten nur um wenige Sekunden, weshalb die Konzentration von 3,5 mM im Hinblick auf die ermittelte Toxizität (Kapitel 4.2.2.1) für die weiteren Experimente gewählt wurde. Um einzuschätzen, wie sich die Polymerisationszeit mit variierender Strahlungsintensität (500 mW/cm²-4000 mW/cm²) unterscheidet, wurde die Polymerisation mit 0,3 % LAP und 3,5 mM Vernetzer durchgeführt. Unabhängig vom Vernetzer verkürzte sich die Polymerisationszeit mit steigender Intensität. Ab einer Intensität von 122

1000 mW/cm² waren die Polymerisationszeiten für alle Vernetzer gleich. Da die Polymerisationszeiten durch Erhöhung der Intensität auf 1000 mW/cm² etwa halbiert werden konnten, wurde die Strahlungsintensität auf 1000 mW/cm² für alle Vernetzer festgelegt um die Bearbeitungszeiten kurz zu halten. Eine Erhöhung der Strahlungsintensität wurde als unproblematisch angesehen werden, da das verwendete Aushärtungssystem Omnicure S2000 (320-500 nm) keinen negativen Einfluss auf bestrahlte Zellen zeigte (Kapitel 3.2.1).¹³⁰

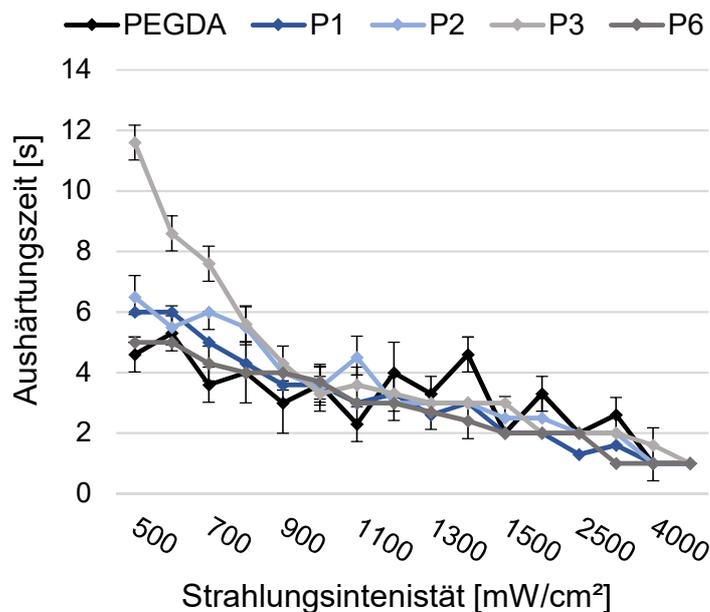


Abbildung 81: Zur Bestimmung der optimalen Aushärtungsbedingungen der Hydrogele mit Vernetzer wurden unterschiedliche Strahlungsintensitäten von 500-5000 mW/cm² untersucht. Je 50 µL der jeweiligen Lösung (5 % GelS, 3,5 mM Vernetzer, 0,3 % LAP) wurden auf einen Objektträger gegeben und mit dem Omnicure S2000 bestrahlt. Die Zeit bis zur optisch erkennbaren Polymerisierung wurde gestoppt. Mit zunehmender Strahlungsintensität verringerte sich die Polymerisationszeit.

Der zur Polymerisation benötigte Photoinitiator LAP wurde ebenfalls in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt und die jeweilige Polymerisationszeit bestimmt. Da LAP ab einer Konzentration von 0,2 % Viabilitäten von unter 50 % im MTT-Assay zeigte, war auch hier das Ziel möglichst wenig Photoinitiator einzusetzen.¹³⁰ Die Polymerisation erfolgte mit 1000 mW/cm². Die gemessenen Polymerisationszeiten sind in Abbildung 82 gezeigt. Für alle Vernetzer konnte eine Abnahme der Polymerisationszeit für steigende LAP-Konzentrationen detektiert werden.

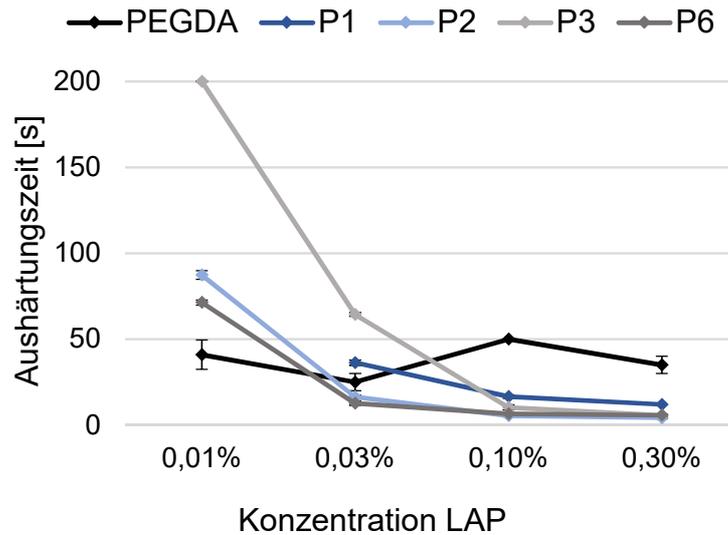


Abbildung 82: Zur Bestimmung der optimalen Aushärtungsbedingungen der Hydrogele mit Vernetzer wurden unterschiedliche LAP-Konzentrationen (0,3 %, 0,1 %, 0,03 %, 0,01 %) untersucht. Je 50 μL der jeweiligen Lösung (5 % Gels, 3,5 mM Vernetzer) wurden auf einen Objektträger gegeben und mit dem Omnicure S2000 (500 mW/cm^2) bestrahlt. Die Zeit bis zur optisch erkennbaren Polymerisierung wurde gestoppt.

Bei einer LAP-Konzentration von 0,01 % zeigte besonders P3 eine lange Aushärtungszeit, die jedoch durch Erhöhung der LAP-Konzentration auf 0,03 % deutlich verringert werden konnte. Gels/P1 ließ sich mit 0,01 % LAP nicht polymerisieren. Mit einer LAP-Konzentration von 0,1 % ließen sich alle Hydrogelvorläuferlösungen unter 30 s polymerisieren. Da der toxische Einfluss von LAP auf eingekapselte Zellen möglichst gering gehalten werden sollte, sich die Polymerisationszeiten der Vernetzer jedoch stark unterschieden wurden individuelle LAP-Konzentrationen und Polymerisationszeiten für die unterschiedlichen Vernetzer festgelegt. Die ermittelten Polymerisationsparameter sind in Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5: Polymerisationsbedingungen für Hydrogele mit Vernetzer.

| Vernetzer | c (Vernetzer) [mM] | Intensität [mW/cm ²] | c (LAP) [%] |
|-----------|-------------------------|-------------------------------------|------------------|
| PEGDA | 3,5 | 1000 | 0,03 |
| P1 | | | 0,3 |
| P2 | | | 0,03 |
| P3 | | | 0,1 |
| P6 | | | 0,03 |

Die ermittelten optimalen Parameter erwiesen sich jedoch im weiteren Verlauf nicht als zuverlässig, sodass die LAP-Konzentration angepasst wurde. Um zu gewährleisten, dass die Polymerisation erfolgreich verläuft, wurde als LAP-Konzentration 0,3 % für alle Zelleexperimente verwendet, da aus der Literatur bekannt ist, dass 0,3 % LAP bei der

Einkapselung von Zellen keinen negativen Einfluss auf die Zellen zeigen. Für die Charakterisierung der physikalischen Eigenschaften wie Grad der Vernetzung, Quellverhalten, Degradation und Rheologie und wurde jeweils 0,1 % LAP verwendet. Durch Verwendung der gleichen LAP-Konzentration in allen Hydrogelen, konnte der Einfluss der Länge des Vernetzers beurteilt werden. Die Polymerisation wurde jeweils durchgeführt und individuell beurteilt, sodass alle Gele bei der Verwendung polymerisiert waren. Um zu beurteilen, wie gut die Vernetzer funktionieren wurde die Anzahl freier Thiol-Gruppen in den vernetzten Hydrogelen ermittelt.

4.2.2.3 Freie Thiol-Gruppen nach der Polymerisation

In Zusammenarbeit mit Johanna Wien wurden die Hydrogele weiter charakterisiert.²²⁴ Der Anteil der nach der Polymerisation noch vorhandenen Thiol-Gruppen gegenüber nicht polymerisiertem GelS zeigt, wie gut die Vernetzungsreaktion funktioniert. Thiol-In Reaktionen zeichnen sich insgesamt durch hohe Reaktionsausbeuten aus und eignen sich deshalb gut als Polymerisationsreaktion.²³³ Da die Vernetzung jedoch maßgeblichen Einfluss auf die Stabilität und Quelleigenschaften eines Hydrogels hat, wurde untersucht, wie viele Thiol-Gruppen tatsächlich mit dem Vernetzer reagiert haben.^{201,202} Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an die Herstellervorgabe und das optimierte Protokoll von Tobias Göckler.¹⁵⁷ Die Bestimmung erfolgte colorimetrisch mit dem Ellman-Assay. Das Ellman-Reagenz reagiert mit freien Thiol-Gruppen zu einem gelben Derivat, dessen Absorption bei 412 nm gemessen werden kann. In Abbildung 83A ist die Reaktion des Ellman-Reagenzes mit freien, deprotonierten Thiol-Gruppen gezeigt.

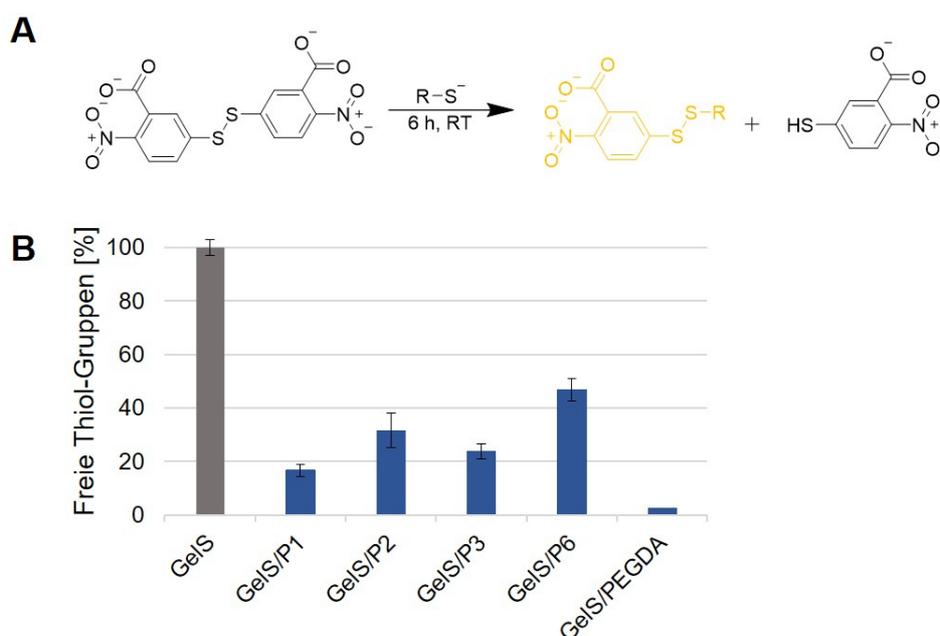


Abbildung 83: Mit dem Ellman-Assay wurde bestimmt, wie viele freie Thiolgruppen nach der Polymerisation von GelS mit einem Vernetzer noch vorlagen. (A) Reaktion des Ellman-Reagenzes mit freien Thiolgruppen, (B) Ergebnisse des Ellman-Assays. Die beste Vernetzung zeigte sich für PEGDA und P1. Die Analyse erfolgte als 6-fach Bestimmung.

Die Hydrogele wurden hergestellt (5 % Gel, 3,5 mM Vernetzer, 0,1 % LAP) und für 6 Stunden bei Raumtemperatur in der Ellman-Lösung inkubiert und die Überstände anschließend zur Absorptionsmessung in eine Multiwell Platte überführt. Die Absorption wurde mit einem Platten-Photometer (SpectraMax ID3, Molecular Devices) bestimmt.

Durch Messen der Absorptionswerte der Proben, sowie der Kontrollen konnte der Anteil freier Thiolgruppen nach der Polymerisation bestimmt werden. Als Blank diente eine GelNB-Lösung, da diese nur die natürlichen Thiolgruppen der Gelatine enthält. Die Bestimmung des Anteils freier Thiol-Gruppen erfolgte durch Vergleich mit der Absorption von GelS. Für PEGDA zeigte sich eine Reaktion nahezu aller Thiol-Gruppen, es konnte lediglich ein Anteil freier Thiole nach der Polymerisation von 2,35 % ermittelt werden. Der Anteil freier Thiol-Gruppen nahm, mit Ausnahme von P1, mit Abnahme der Länge des Vernetzers zu. Für P6 zeigte sich der größte Anteil freier Thiol-Gruppen mit 46,8 %, P2 zeigte ein Anteil von 31,6 % und P3 einen Anteil von 23,7 %. Der Vernetzer P1 vernetzte 88 % der Thiole von GelS. Die Polymerisation mit P1 führte zum geringsten Anteil freier Thiol-Gruppen. Möglicherweise ist dies neben der Anzahl der Monomere auch auf die Seitenketten zurückzuführen. Im Vergleich mit dem Tetramer P2 und dem Hexamer P3 führte die Polymerisation mit P1 zu weniger freien Thiol-Gruppen. P3 besteht aus Monomeren mit der gleichen Seitenkette, während P2 Seitenketten aus Ethylendiamin enthält, die um zwei Kohlenstoffatome kürzer waren. Dass P6 zum größten Anteil freier Thiole führte, liegt möglicherweise daran, dass der Vernetzer sehr kurz ist und sich zur Vernetzung die Reaktionspartner in unmittelbarer räumlicher Nähe befinden müssen. P6 konnte also nur Gelatineketten verbinden, die zwei nahebeieinanderliegende Thiole aufwiesen. Der Anteil freier Thiol-Gruppen nach der Polymerisation lässt auch eine Aussage über den Grad der Vernetzung zu. So konnte für alle Vernetzer eine Vernetzung von mehr als 50 % der Thiol-Gruppen in GelS detektiert werden. Neben PEGDA eignen sich auch Peptoide als effektive Vernetzer für GelS. Der verwendete Vernetzer kann durch seine Sequenz und die damit einhergehende Länge und Seitenketten das Quellverhalten, also die Flüssigkeitsaufnahme, der polymerisierten Hydrogele beeinflussen. Kurze Vernetzer führen im Allgemeinen zu kleineren Poren und festeren Netzwerken, wodurch die Flüssigkeitsaufnahme eingeschränkt sein könnte.^{201,202}

4.2.2.4 Quelleigenschaften

Die in den Hydrogelen vorhandenen Carboxyl-, Amino- oder Sulfonylgruppen geben den Gelen die Eigenschaft große Mengen Flüssigkeiten aufzunehmen und zu speichern. Sie können so den *in vivo* Flüssigkeitsgehalt nachbilden.¹² Da nicht alle Gewebe den gleichen Flüssigkeitsgehalt haben, ist es wichtig, dass die Flüssigkeitsaufnahme durch die Polymerkonzentration, den verwendeten Vernetzer oder den Grad der Vernetzung gesteuert werden kann.⁴ Um zu evaluieren wie gut die Hydrogele mit Vernetzer wässrige Flüssigkeiten aufnehmen und quellen, wurde der Flüssigkeitsgehalt und die *swelling ratio* bestimmt. Hierfür

wurde eine in der Literatur beschriebene gravimetrische Methode nach Lou *et al.* und Noshadi *et al.* angewendet.^{234,235} Zur Analyse der Quelleigenschaften wurden je 100 μL der Hydrogelvorläuferlösung (5 % Gel, 3,5 mM Vernetzer, 0,1 % LAP) auf einem PDMS-beschichteten Objektträger polymerisiert und anschließend lyophilisiert. Das Trockengewicht (m_{dry}) der Hydrogele wurde mit einer Feinwaage bestimmt und die Gele für bis zu 72 Stunden in DPBS⁻ zum Quellen eingelegt. Alle 24 Stunden wurde das Nassgewicht (m_{wet}) mit einer Feinwaage gemessen, bis nach 72 Stunden keine Veränderung mehr festgestellt wurde. Die Berechnung des Flüssigkeitsgehaltes erfolgte nach Lou *et al.* mit folgender Formel.

$$\text{Flüssigkeitsgehalt} = \frac{m_{\text{wet}} - m_{\text{dry}}}{m_{\text{wet}}} \times 100 \%$$

Der Flüssigkeitsgehalt gibt an, wie groß der Anteil der Flüssigkeit am Nassgewicht ist. Die *swelling ratio* gibt das Verhältnis von Nass- zu Trockengewicht an und damit wie stark das Hydrogel gequollen ist und wurde nach Noshadi *et al.* berechnet.

$$\text{swelling ratio} = \frac{m_{\text{wet}}}{m_{\text{dry}}}$$

Die ermittelten Quelleigenschaften sind in Abbildung 84 dargestellt.²²⁴

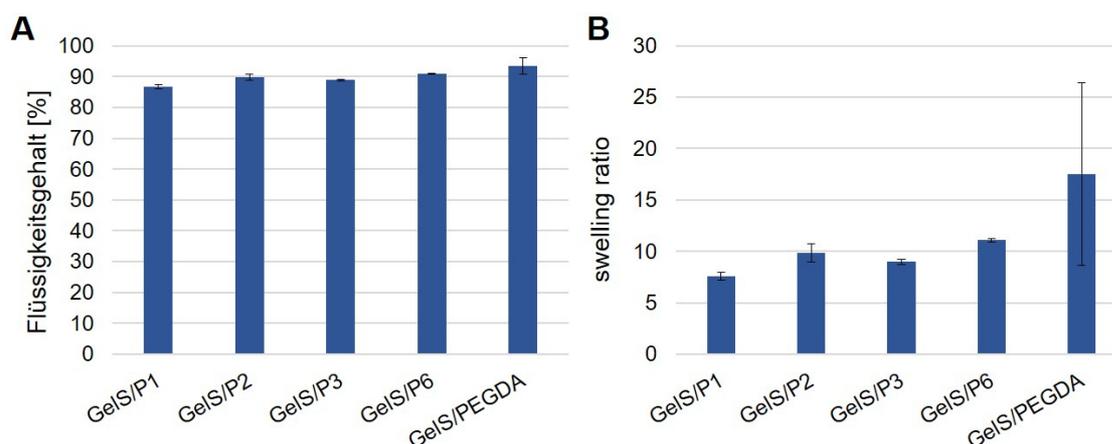


Abbildung 84: Ergebnisse der Untersuchung des Quellverhaltens der Hydrogele mit Vernetzer. Es wurden der Flüssigkeitsgehalt und die *swelling ratio* der Gele (5 % GelS, 0,3 % LAP, Vernetzer) bestimmt. Die Messung erfolgte als Triplikat. (A) Flüssigkeitsgehalt, (B) *swelling ratio*.

Nach vollständigem Quellen zeigten alle untersuchten Hydrogele einen Flüssigkeitsgehalt von über 85 %. Ein Zusammenhang mit dem Vernetzer konnte nur bedingt festgestellt werden, da die Unterschiede zwischen den einzelnen Gelen sehr klein waren. Entgegen der Annahme, dass kurze Vernetzer zu einer verminderten Aufnahme von Flüssigkeiten führen, zeigte GelS/P6 einen höheren Flüssigkeitsgehalt als P3. Eine Erklärung hierfür könnte jedoch sein, dass die geringere Vernetzung von P6 im Vergleich zu P3 nicht zu einem dichteren Netzwerk als mit P3 geführt hat. Der gleiche Effekt konnte auch für GelS/P2 detektiert werden. Den insgesamt höchsten Flüssigkeitsgehalt zeigte wie erwartet PEGDA, da die lange PEG-Kette auch bei vollständiger Reaktion zu einem loserem Netzwerk führt.²³⁶ Da die Unterschiede insgesamt nur wenige Prozent betragen, wurde kein Zusammenhang zwischen Vernetzer und

Flüssigkeitsgehalt definiert. Die in Abbildung 84B gezeigten Ergebnisse für die *swelling ratio* zeigten ebenfalls nur geringe Unterschiede zwischen den Vernetzern. Jedoch fällt auf, dass sich die *swelling ratio* für GelS/PEGDA stark von denen der anderen Hydrogele unterscheidet. GelS/PEGDA wies nach dem Quellen das 16-fache seines Ursprungsgewichtes auf, während die anderen Hydrogele lediglich maximal eine Verzehnfachung erreichten. Die niedrigste *swelling ratio* konnte für GelS/P1 ermittelt werden. Durch die starke Vernetzung von GelS/P1 im Vergleich zu den anderen Peptoiden wurde das Quellen möglicherweise eingeschränkt. Für eine definitive Aussage über einen Zusammenhang zwischen dem Vernetzer und der *swelling ratio* waren die Unterschiede jedoch zu gering und die Ergebnisse für den langen Vernetzer PEGDA mit einer zu großen Standardabweichung behaftet. Insgesamt war die Flüssigkeitsaufnahme und *swelling ratio* jedoch ausreichend hoch um die Peptoide als Vernetzer von GelS in der Zellkultur einsetzen zu können. Alle untersuchten Gele waren in der Lage hohe Mengen Flüssigkeiten aufzunehmen und zu speichern. Insgesamt konnte jedoch gezeigt werden, dass bei deutlichen Unterschieden in der Länge des Vernetzers, wie er zwischen den Peptoiden und PEGDA besteht, die Quelleigenschaften beeinflusst und an das jeweilige Gewebe angepasst werden können. Sollen Hydrogele im Tissue Engineering erfolgreich als Ersatz für die ECM eingesetzt werden, so müssen sie eine hohe Dynamik aufweisen und von Zellen ab- und umgebaut werden können. Dies wird unter anderem dadurch erreicht, dass die Hydrogele bioabbaubar und damit durch Zellen beeinflussbar sind.¹ In Hydrogelen als Matrix eingekapselte Zellen müssen ihre Umgebung an ihre Anforderungen anpassen können zum Beispiel um mehr Platz für eine Elongation und Proliferation zu erhalten und eine Signaltransduktion zu gewährleisten.^{1,39} Gleichzeitig darf die Stabilität der Gele nicht zu schnell abnehmen, damit die Matrix ihre strukturgebende Funktion nicht verliert.⁶ Um zu evaluieren, wie bioabbaubar und stabil die Hydrogele mit Vernetzer sind wurden diese in verschiedenen Medien inkubiert und der Abbau verfolgt.

4.2.2.5 Degradation

Die als Basis dienende Gelatine verfügt über Protease-sensitive Schnittstellen, die spezifische Schnittstellen für Matrix-Metallo-Proteasen (MMP) sind. Durch MMP kann die Gelatine abgebaut werden. Die Ketten der Gelatine werden so immer weiter gekürzt, bis das Gele seine Netzwerkstruktur verliert und sich auflöst.^{237,238} Zur Untersuchung der Degradation der Hydrogele wurden Hydrogelvorläuferlösungen (5 % Gel, 3,5 mM Vernetzer, 0,1 % LAP) in DMEM (10 % FCS, 1% P/S) und DPBS^{-/-} (10 % FCS) angesetzt und je 200 µL auf einem mit PDMS beschichteten Objektträger mit dem Omnicure S2000 (320-500 nm, 1000 mW/cm²) polymerisiert. Die polymerisierten Gele wurden lyophilisiert und anschließend die Masse der getrockneten Gele mit einer Feinwaage bestimmt (Tag 0). Die an Tag 0 bestimmte Masse diente als 100 %-Wert. Für jeden Entnahmzeitpunkt wurde ein Gel hergestellt und lyophilisiert. Die Gele wurden in der jeweiligen Lösung eingelegt, bei 37 °C inkubiert und zu

den jeweiligen Zeitpunkten entnommen. Die Inkubationslösung wurde alle 48 Stunden erneuert. Die Gele wurden lyophilisiert und die Masse der getrockneten Gele ermittelt. Nach Noshadi *et al.* wurde der noch verbleibende Anteil des Geles berechnet. Der verbleibende Anteil ist das Verhältnis der Trockengewichte von Tag 0 und dem Entnahmezeitpunkt in %.²³⁴ Die berechneten verbleibenden Anteile der einzelnen Hydrogele mit Vernetzer sind in Abbildung 85 dargestellt.²²⁴

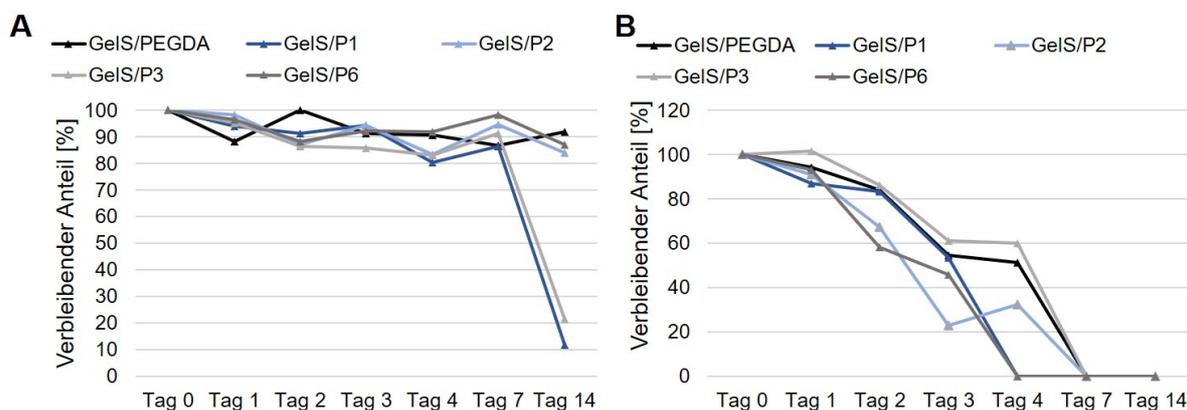


Abbildung 85: Degradationsverhalten der Hydrogele mit Vernetzer in unterschiedlichen Medien. Die polymerisierten Gele wurden in verschiedenen Medien (DPBS^{-/-} mit 10 % FCS, DMEM mit 1 % P/S und 10 % FCS) eingelegt und zu bestimmten Zeitpunkten (Tag 0, Tag 1, Tag 2, Tag 3, Tag 4, Tag 7, Tag 14) entnommen. Durch Bestimmung der Masse nach dem Lyophilisieren konnte untersucht werden wie schnell sich die Gele abbauen. (A) Abbau DMEM mit 1 % P/S und 10 % FCS, (B) Abbau in DPBS^{-/-} mit 10 % FCS.

Die Degradation der Hydrogele mit Vernetzer in DMEM (10 % FCS, 1 % P/S) ist in Abbildung 85A dargestellt. Die Hydrogele GelS/PEGDA, GelS/P2 und GelS/P6 wiesen auch nach 14 Tagen Inkubation in DMEM (10 % FCS, 1 % P/S) bei 37 °C noch einen verbleibenden Anteil von über 80 % auf. GelS/P1 und GelS/P3 verloren zwischen Tag 7 und Tag 14 einen Großteil ihrer Masse, das Trockengewicht von GelS/P1 reduzierte sich im Vergleich zum Startwert um 89 %, die Masse von GelS/P3 um 79 %. Entgegen der Erwartung, dass weniger stark vernetzte Hydrogele schneller abgebaut werden, zeigten GelS/P1 und GelS/P3 einen stärkeren Abbau, obwohl für diese Hydrogele im Ellman-Assay (Kapitel 4.2.2.3) eine stärkere Vernetzung als für GelS/P2 und GelS/P6 nachgewiesen wurde. Die Stabilität von GelS/PEGDA entsprach hingegen den Erwartungen, da PEGDA keine Proteaseinstabilität aufweist. Betrachtet man nur die Länge der Peptoid-Vernetzer, so zeigte sich an Tag 14 ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Peptoiden. Von GelS/P6 war ein größerer Anteil noch vorhanden als von GelS/P2 und GelS/P3, erneut bildete GelS/P1 eine Ausnahme. Ein Grund für das unterschiedliche Abbauverhalten der Peptoid-haltigen Hydrogele könnte sein, dass die Sequenz der Peptide neben der Länge des Vernetzers Einfluss auf den Abbau nimmt. P1 und P3 verfügen über Seitenketten aus N-1,4-Diaminobutan, während P2 Seitenketten aus dem kürzeren Ethylendiamin und P6 keine Seitenketten besitzt. Möglicherweise fördern die längeren Seitenketten aus N-1,4-Diaminobutan, die *Lysin* ähneln, die Anlagerung von Enzymen. Eine abschließende Erklärung für das Abbauverhalten in DMEM konnte nicht

gefunden werden. Da die Bestimmung ausschließlich als Unikat erfolgte, konnte auch ein Handhabungsfehler nicht vollständig ausgeschlossen werden. Der geringe Abbau von 20 % gegenüber dem Startwert zeigte, dass die Gele bioabbaubar sind, aber gleichzeitig sehr stabil. Neben der Inkubation in DMEM (10 % FCS, 1 % P/S) wurden die Gele auch in DPBS^{-/-} mit 10 % FCS eingelegt, die ermittelten Anteile sind in Abbildung 85B gezeigt. Für alle Gele konnte ein kontinuierlicher Abbau detektiert werden. GelS/P6 und GelS/P1 waren bereits an Tag 4 vollständig abgebaut, GelS/PEGDA, GelS/P2 und GelS/P3 an Tag 7. Für alle Gele zeigte sich ein schnellerer Abbau als in DMEM (10 % FCS, 1 % P/S), obwohl in beiden Lösungen gleich viel FCS vorhanden war. FCS enthält Enzyme, die an den MMP-Schnittstellen die Gelatine angreifen können und die Ketten kürzen, bis das Gel seine Netzwerkstruktur verliert und sich auflöst.

4.2.2.6 Toxizität der Abbauprodukte

Für den Aufbau von artifiziellen Geweben müssen die Zellen direkt in die umgebende Matrix eingebettet werden. Durch das zur Versorgung verwendete Zellkulturmedium und die eingekapselten Zellen werden die als Matrix fungierenden Hydrogele um- und abgebaut. Dabei entstehen Abbauprodukte, die bis zum Wechsel des Mediums im Konstrukt verbleiben. Diese Abbauprodukte, nicht-zellulärer und zellulärer Herkunft, dürfen sich nicht negativ auf die eingekapselten Zellen auswirken. Durch den enzymatischen Abbau des Gelatinerückgrates der Hydrogele können Produkte entstehen, die zum Beispiel verschieden lange Gelatineketten mit Resten der Vernetzungspartner oder freie photoreaktive Gruppen enthalten. Um die Toxizität dieser Produkte zu beurteilen, wurden Hydrogele (hergestellt mit den ermittelten optimalen Bedingungen, Tabelle 5) ohne und mit eingekapselten NHDF in DMEM (10 % FCS, 1 % P/S) unter Zellkulturbedingungen inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten Proben des Medium entnommen und in einem MTT-Assay analysiert. In Abbildung 87 ist das Vorgehen schematisch dargestellt.

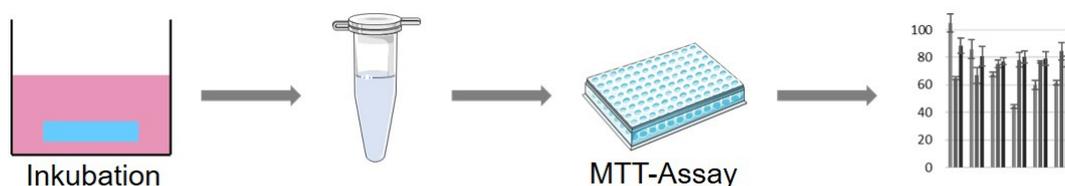


Abbildung 86: Probenvorbereitung und MTT-Assay zur Bestimmung der Toxizität von Abbauprodukten von Hydrogelen mit Vernetzer. Die Hydrogele wurden in DMEM inkubiert.

Zur Generierung der Abbauprodukte wurde die GelS Stammlösung (6,95 %) mit LAP und DPBS^{-/-} beziehungsweise Zellsuspension ($2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) verdünnt, sodass die Konzentration 5 % betrug. Je 200 μ l der Lösung wurden in einer Kavität eines 8-Well μ -slides gegeben und mit den jeweiligen Bedingungen (Tabelle 5) polymerisiert. Nach der Polymerisation wurden die Gele entnommen und in eine 24-Well Platte überführt. Zu jedem

Gel wurden 700 µl DMEM (10 % FCS, 1 % P/S) gegeben und die Gele unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (3 Stunden, 24 Stunden, 3 Tage, 7 Tage, 14 Tage, 21 Tage) wurde das Medium entnommen und durch frisches ersetzt. Mit den entnommenen Proben wurde dann ein MTT-Assay mit NHDF durchgeführt. Für den MTT-Assay wurden $0,5 \times 10^4$ NHDF/Well in einer 96-Well Platte ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Vor der Behandlung wurde in den Kontrollen das Medium gewechselt und das Medium in den anderen Wells durch die zu analysierende Lösung ersetzt. Zur Behandlung der NHDF wurden die entnommenen Proben 1:10 verdünnt, um einen Einfluss auf die Viabilität durch einen Mangel an Medium auszuschließen. Die Zellen wurden für 72 Stunden mit den Lösungen inkubiert und anschließend die Viabilität mit MTT bestimmt. Nach der Zugabe von MTT und einer Inkubation von 3 Stunden wurden die Zellen lysiert um den violetten Farbstoff Formazan in Lösung zu bringen. Die Absorption des Farbstoffes bei 595 nm wurde gemessen (SpectrMax ID3, Molecular Devices) und daraus als *test-over-control* die Viabilität bestimmt. In Abbildung 87A sind die ermittelten Viabilitäten für nicht-zelluläre Abbauprodukte gezeigt. Nach einer Inkubationszeit der Gele von 3 Stunden war für alle Hydrogele eine Viabilität von über 95 % zu detektieren. Für GeIS/PEGDA konnte bis Tag 7 eine Abnahme der Viabilität auf 62 % ermittelt werden. Bis Tag 21 stieg die Viabilität wieder auf über 80 % an. Für die Gele mit Peptoiden konnten für alle Entnahmezeitpunkte Viabilitäten über 75 % detektiert werden. Die letale Dosis 50 wurde im untersuchten Zeitraum nicht erreicht. Eine Abhängigkeit der Toxizität vom verwendeten Vernetzer konnte ebenfalls nicht festgestellt werden.

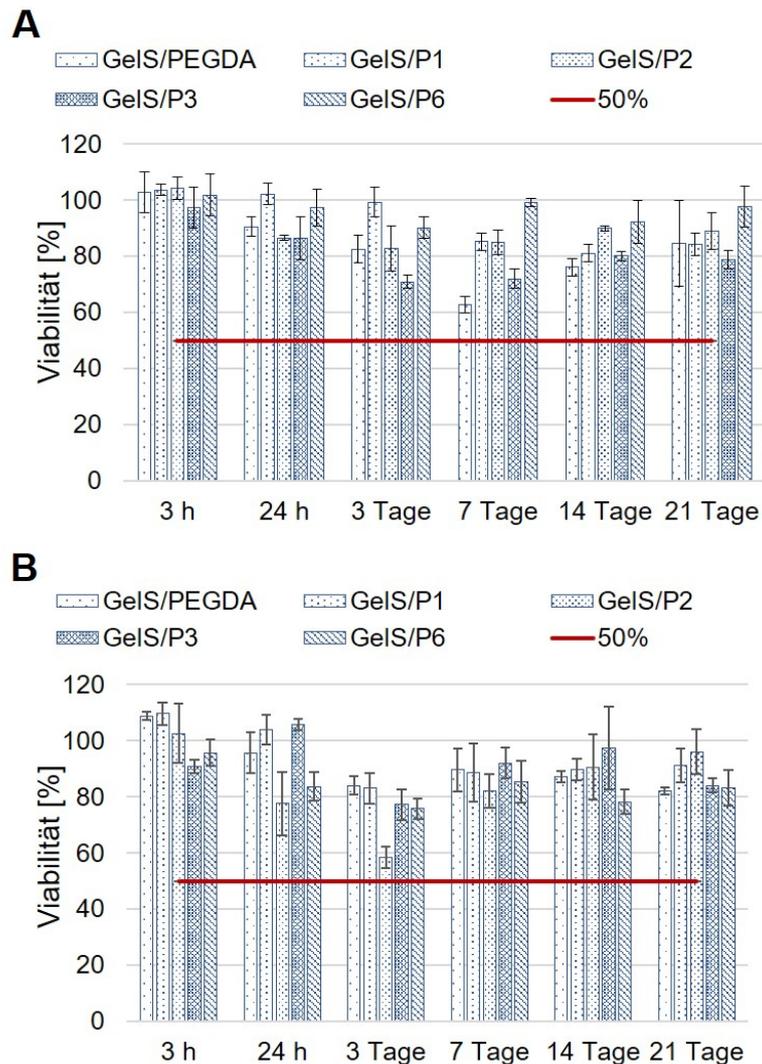


Abbildung 87: Ergebnisse des MTT-Assay zur Bestimmung der Toxizität von nicht-zellulären und zellulären Abbauprodukten von Hydrogelen mit Vernetzer auf NHDF. Die vernetzten Gele wurden in DMEM mit 10 % FCS inkubiert. Die Probenentnahme erfolgte nach 3 h, 24 h, 3 Tagen, 7 Tagen, 14 Tagen und 21 Tagen. Die NHDF wurden für 72 Stunden mit den Proben inkubiert. Der Mittelwert wurde mit $n=3$ berechnet, die Standardabweichung mit $n-1$. (A) nicht-zelluläre Abbauprodukte, (B) zelluläre Abbauprodukte.

Um zu beurteilen, wie sich von Zellen verursachte Abbauprodukte auf NHDF auswirken wurde mit den Proben der Hydrogele mit eingekapselten NHDF ebenfalls ein MTT-Assay durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 87B gezeigt. Für alle Entnahmezeitpunkte wurden Viabilitäten über 80 % detektiert, lediglich für zum Zeitpunkt Tag 3 konnte eine Viabilität unter 80 % detektiert werden. Die gleichbleibend hohen Viabilitäten von nicht-zellulären und zellulären Abbauprodukten bestätigten erneut die Eignung von Hydrogelen mit Vernetzer für den Einsatz im *Tissue Engineering* aus toxikologischer Sicht. Es konnte gezeigt werden, dass die Länge und Zusammensetzung des Vernetzers nach der Polymerisierung keinen Einfluss auf die Toxizität der Abbauprodukte nahm. Dies entsprach den Erwartungen, da sich auch für die Vernetzer selbst keine sehr großen Unterschiede in der Toxizität zeigten. Die erhöhte Toxizität von PEGDA ($LD_{50/10min}$ 400 μ M) gegenüber den Peptoiden ($LD_{50/10min}$ 10 mM) zeigte

sich in der Toxizität der Abbauprodukte nicht. Neben der Einordnung der Toxikologie eines Materials sind auch dessen viskoelastische Eigenschaften von Bedeutung, da nicht alle Gewebe gleich weich oder fest sind. Die Festigkeit einer Matrix beeinflusst Zellen in ihrer Funktion, Differenzierung und Proliferation. Um ein Material für die Generierung eines bestimmten Gewebes einsetzen zu können müssen deshalb auch dessen viskoelastische Eigenschaften beeinflussbar sein um die *in vivo* Gegebenheiten möglichst gut nachbilden zu können.

4.2.2.7 Rheologie

Aus der Literatur ist bekannt, dass Vernetzer mit unterschiedlichen Längen zu unterschiedlich festen Materialien führen. Zusätzlich spielt hier auch der Grad der Vernetzung eine Rolle.²³⁶ So können zum Beispiel Gele mit einem kurzen Vernetzer ebenfalls zu sehr weichen Netzwerkstrukturen führen, wenn der Grad der Vernetzung gering ist. Um die Festigkeit der Hydrogele mit Vernetzer zu beurteilen, wurde der Speichermodul G' bestimmt. Der Speichermodul G' beschreibt das elastische Verhalten einer Probe, also die Energie, die bei einer Verformung im Material gespeichert wird. Die Messung des Speichermoduls G' erfolgte für die Gele mit Vernetzer und deren Vorläuferlösungen mit dem kontaktlosen Messprinzip von Rheolution. Mit dem ElastoSens Bio (Rheolution Inc) wurde der Speichermodul G' ermittelt. Die Messtechnologie des ElastoSens Bio (Rheolution Inc) ist schematisch in Abbildung 88 dargestellt.¹²⁹

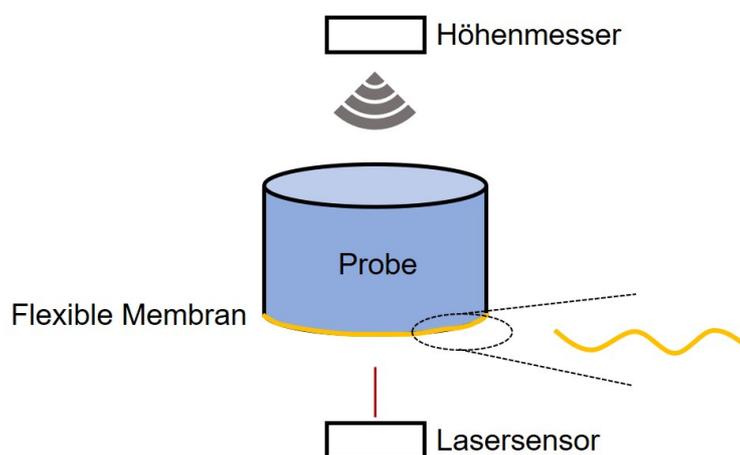


Abbildung 88: Schematische Darstellung der kontaktlosen Messung des Speichermoduls von weichen Materialien. Durch Vibrationen wird die Probe in Schwingung versetzt, wodurch die flexible Membran sowie die Probenoberfläche ausgelenkt werden. Durch einen Lasersensor und eine Höhenmessung wird so der Speichermodul von weichen Materialien bestimmt.¹²⁹

Die zu untersuchende Probe wird in einem Probenhalter in das Gerät eingebracht und mit dem Probenhalter leichten Vibrationen ausgesetzt. Dadurch werden die Probenoberfläche und die flexible Membran ausgelenkt. Die Auslenkung der Membran wird kontinuierlich mit einem Lasersensor erfasst, gleichzeitig wird die Höhe der Probe gemessen. Die Auslenkung der Membran ist abhängig von ihren viskoelastischen Eigenschaften, den viskoelastischen

Eigenschaften der Probe und dem Probenvolumen. Da die viskoelastischen Eigenschaften der Membran, sowie die Dimensionen der Probe zu jedem Zeitpunkt bekannt sind, kann aus der Auslenkung der Membran der Speichermodul G' berechnet werden. Für festere Materialien als die hier untersuchten Gele kann auch der Verlustmodul G'' und der Verlusttangens bestimmt werden.¹²⁹ Die gemessenen Speichermodule sind in Abbildung 89 gezeigt. Für die Messung wurden 7 ml der Hydrogelvorläuferlösung (5 % GelS, 3,5 mM Vernetzer, 0,1 % LAP, DPBS^{-/-}) in den Probenhalter gegeben und in das ElastoSens Bio eingesetzt. Die Lösung wurde auf 14 °C abgekühlt und die Messung gestartet. Für Messzeiträume von 50-70 min wurde alle 10 s ein Messpunkt aufgezeichnet. Abbildung 89A zeigt die Messung für die Hydrogelvorläuferlösungen bei 14 °C. Zu Beginn der Messung stieg der Speichermodul für alle Lösungen exponentiell an. Mit sinkender Temperatur lagern sich die Helices der Gelatine zu stabilen Triplehelices zusammen und die Festigkeit der Lösung steigt. Da die Lösungen zu Beginn der Messung noch nicht vollständig abgekühlt waren, stieg der Speichermodul zunächst stark an. Mit längerer Messzeit näherten sich die Speichermodule von GelS/P1, GelS/P2 und GelS/P6 dem gleichen Wert für G' . Bei Erreichen der Plateau-Phase wurde für GelS/P3 ein höherer Speichermodul G' als für die anderen Lösungen detektiert. Alle gemessenen Speichermodule lagen jedoch in einer Größenordnung, so dass kein definierter Zusammenhang zwischen dem Vernetzer und dem Speichermodul festgestellt werden konnte. Da die Vernetzer im Vergleich zur Gelatine sehr klein sind, wurde davon ausgegangen, dass das Zusammenlagern der Triplehelices der Gelatine bei sinkender Temperatur nicht behindert wurde. Nach erfolgter Messung der Lösung wurde diese auf 37 °C erwärmt und mit den integrierten LED (365 nm, 385 nm) polymerisiert. Mit der Polymerisierung wurde die Messung gestartet. Die gemessenen Speichermodule sind in Abbildung 89B gezeigt.

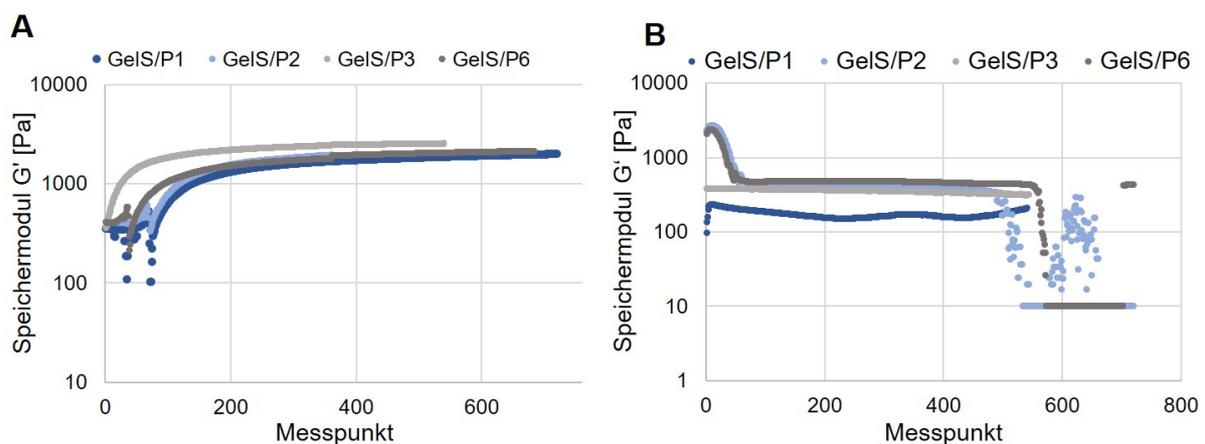


Abbildung 89: Mit dem ElastoSens Bio (Rheolution Inc) wurden die Speichermodule von Hydrogelen mit Vernetzern und ihrer Vorläuferlösungen bestimmt. (A) Aufgezeichnete Speichermodule von nicht polymerisierten Hydrogelvorläuferlösungen bei 14 °C, (B) Aufgezeichnete Speichermodule von Hydrogelen mit Vernetzer bei 37 °C während und nach der Polymerisierung. In Kooperation mit der Masterstudentin Johanna Wien.²²⁴

Über den gesamten Verlauf der Messung zeigte GelS/P1 ein deutlich niedrigeren Speichermodul G' als die Hydrogele GelS/P2, GelS/P3 und GelS/P6. Für alle Hydrogele wurde

mit zunehmender Messzeit ein konstanter Speichermodul G' erhalten. Zum besseren Vergleich der Speichermodule wurden die Plateau-Speichermodule für die Hydrogele ermittelt (Abbildung 90). Den niedrigsten Speichermodul G' von 166 Pa wies GelS/P1 auf, den höchsten GelS/P6 mit 452 Pa. Die Plateau-Speichermodule von GelS/P2 und GelS/P3 betragen 403 Pa und 355 Pa. Mit Ausnahme von GelS/P1 konnte ein Zusammenhang zwischen der Länge des Vernetzers und der Festigkeit festgestellt werden. Mit Abnahme der Länge des Vernetzers nahm der Speichermodul G' zu. Die Unterschiede waren jedoch sehr gering, sodass sich die Festigkeiten alle in einem Bereich befanden, der als gleich anzusehen war.

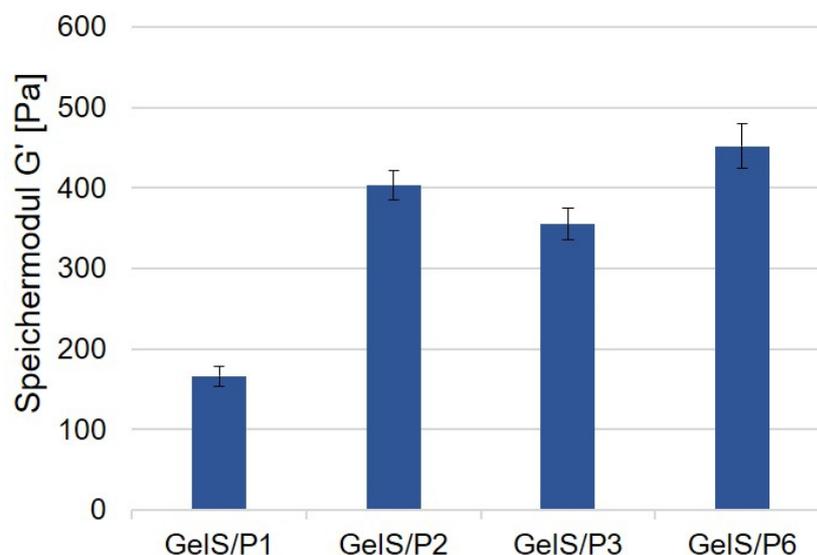


Abbildung 90: Plateau-Speichermodule der Hydrogele mit Vernetzer. Die Messung erfolgte bei 37 °C mit dem ElastoSens Bio als Unikat.

Warum GelS/P1 einen viel niedrigeren Speichermodul G' aufwies, könnte daran liegen, dass sich die Seitenketten von denen von GelS/P2 unterschieden. Diese könnten durch ihre Länge einen Einfluss auf die viskoelastischen Eigenschaften haben, welcher sich jedoch mit zunehmender Anzahl dieser Seitenketten nicht mehr zeigte (GelS/P3). Es scheint also ein zusätzlicher Zusammenhang zwischen Seitenkette und Vernetzerlänge zu bestehen. Durch die rheologische Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass sich der Speichermodul durch den Vernetzer beeinflussen lässt und so die Eigenschaften eines Matrix-Materials eingestellt und angepasst werden können. Um einen genaueren Zusammenhang zwischen dem Vernetzer und den Eigenschaften eines Hydrogels festzustellen, müssen die Experimente mit Vernetzern mit deutlicheren Unterschieden in ihrer Länge wiederholt werden. Die Charakterisierung der Hydrogele mit Vernetzer zeigte, dass die Hydrogele in ihren Eigenschaften kontrolliert beeinflussbar sind und sich aus dieser Sicht für den Einsatz als Matrix-Material eignen. In einem nächsten Schritt wurde die Biokompatibilität der Hydrogele evaluiert.

4.3 Biokompatibilität

Für den Aufbau von artifiziellem Gewebe muss das als Matrix verwendete Material die Proliferation und Migration von Zellen ermöglichen, gleichzeitig darf es nicht toxisch auf die Zellen wirken.^{1,4,147} Durch die toxikologische Untersuchung der Vorläuferlösungen und Vernetzer, sowie der Abbauprodukte konnte die Toxizität dieser als gering eingeschätzt werden. Um zu beurteilen, ob auch die polymerisierten Hydrogele und der Herstellungsprozess biokompatibel sind, wurden Zellen in die Hydrogelvorläuferlösung gemischt und in die Hydrogele eingekapselt. Gelatine-basierte Hydrogele verfügen von Natur aus über Zellinteraktionsdomänen, wie die RGD-Domäne. Über diese Aminosäuresequenz in der Gelatineketten könne Zellen über Integrin-Rezeptoren mit der Matrix interagieren.¹⁵² Die in der Gelatine enthaltenen MMP-Schnittstellen ermöglichen es Zellen außerdem das Hydrogel zu degradieren und umzustrukturieren. Damit Zellen in einem Hydrogel proliferieren und funktionieren können, muss die Interaktion und die Umstrukturierung der Umgebung durch die Zellen möglich sein.^{1,4} Um zu beurteilen, wie biokompatibel die Hydrogele mit Vernetzer sind, wurden Zellen eingekapselt (Abbildung 95) und das Verhalten der Zellen im Hinblick auf Elongation, Bildung von Zell-Zell-Kontakten und Proliferation untersucht.

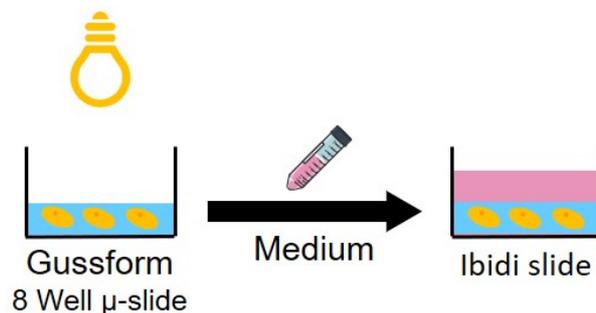


Abbildung 91: Schematische Darstellung der Einkapselung von Zellen in Hydrogele. Je 200 µL einer Hydrogelvorläuferlösung mit Zellen wurden in die Gussform gegeben und polymerisiert. Anschließend wurden die Gele mit Zellkulturmedium überschichtet und bei Zellkulturbedingungen inkubiert.

4.3.1 Viabilität von eingekapselten HepG2

Im ersten Schritt zu Evaluierung der Biokompatibilität wurden humane Leberkrebszellen, HepG2, in Zusammenarbeit mit Sonja Leopold in die Hydrogele mit Vernetzer eingebettet.²²³ Für die Einbettung wurden die HepG2 in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml in die Hydrogelvorläuferlösung (5 % GelS, 3,5 mM Vernetzer, 0,3 % LAP) gemischt und je 200 µl der Lösung im 8-Well µ-slide mit dem Omnicure S2000 polymerisiert (320-500 nm, 1000 mW/cm²). Die polymerisierten zellhaltigen Gele wurden mit DMEM überschichtet und bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. An Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 wurde eine Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM (4 µM) und PI (0,02 mg/ml) durchgeführt. Zur Visualisierung wurden mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Leica TCS SPE) Z-Stacks aufgezeichnet (Höhe 300 µm, Schrittgröße 5 µm), die 3D Rekonstruktion der Z-Stacks erfolgte mit der Software LasX. Die aufgenommenen Z-Stacks sind in Abbildung 92

gezeigt. Für die Hydrogele GelS/PEGDA und GelS/P2 war eine Kultivierung nur bis Tag 7 beziehungsweise Tag 14 möglich. Zum Zeitpunkt Tag 0 zeigten GelS/P2 und GelS/P6 den größten Anteil grün fluoreszierender Zellen, während in GelS/P1 und GelS/P3 deutlich weniger grün fluoreszierende Zellen detektiert wurden. An Tag 7 wiesen alle Hydrogele mit Vernetzer ähnlich viele grün fluoreszierende Zellen auf. An Tag 14 konnten in GelS/P2 grün fluoreszierende Ansammlungen von HepG2 detektiert werden. Mit zunehmender Kultivierungszeit nahm in den Hydrogelen GelS/P1 und GelS/P3 der Anteil nekrotischer Zellen stark zu, an Tag 21 waren keine viablen HepG2 mehr zu erkennen. Die großen Anteile nekrotischer Zellen wurden durch die vorangegangenen Experimente nicht erwartet, da in den MTT-Assays der Vernetzer P2 für 72 Stunden Inkubation die höchste Toxizität zeigte. Die Ergebnisse aus 2D Assays lassen sich jedoch nur bedingt auf Zellen in einer 3D Anordnung übertragen.^{7,15} Da sich jedoch in allen Hydrogelen zu Beginn der Kultivierungszeit viable Zellen nachweisen ließen, wurde dennoch von einer hohen Biokompatibilität ausgegangen. Die Hydrogele erwiesen sich besonders in der Handhabung mit zunehmender Zeit schwer, da das starke Quellen einen Mediumwechsel ab Tag 7 nicht mehr zuließ. Aus diesem Grund wurde ab Tag 7 nur noch Medium zugegeben, es verblieben also alle Abbauprodukte und Abfallstoffe in den Gelen. Dies könnte dazu geführt haben, dass die Zellen einem Nährstoffmangel ausgesetzt waren und sich deshalb der Anteil nekrotischer Zellen erhöhte. Eine Veränderung der Zellmorphologie konnte nicht beobachtet werden. Die Tiefenfärbung zur Bestätigung der 3D Verteilung ist in Abbildung 115 (Anhang) gezeigt.

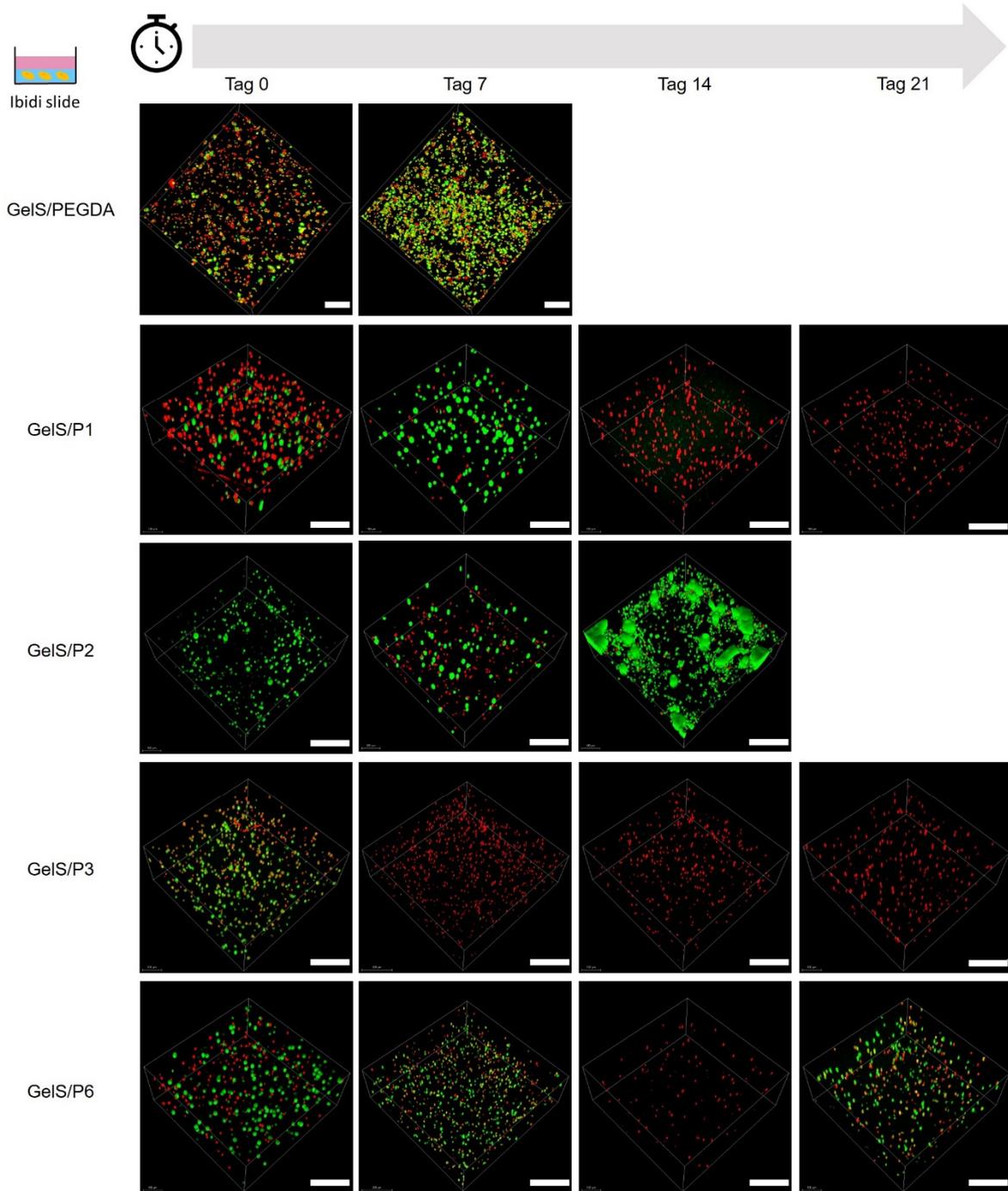


Abbildung 92: Lebend-Tot-Färbung von in Hydrogelen mit Vernetzer eingekapselten HepG2 im 8-Well μ -slide zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 0, Tag 7, Tag 14 Tag 21). Die Färbung erfolgte mit Calcein-AM und PI und wurde mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica TCS SPE, 10x Objektiv, Zoom 1,5, grün Ex. 488 nm, Em. 495-584 nm; rot Ex.532 nm, Em. 610-700 nm) visualisiert. Es wurden Z-Stacks mit einer Höhe von 300 μ m aufgezeichnet (Schrittgröße 5 μ m). Die Rekonstruktion der Z-Stacks zur 3D Anordnung erfolgte mit der Software Leica LasX. Maßstab 200 μ m.

Um zu überprüfen, ob sich der Effekt der sinkenden Viabilitäten auch für Primärzellen zeigt, wurden NHDF in die Hydrogele eingebettet und zu den selben Zeitpunkten eine Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM (4 μ M) und PI (0,02 mg/ml) durchgeführt.²²³

4.3.2 Viabilität von eingekapselten NHDF

Die NHDF wurden in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml in die Hydrogelvorläuferlösung gemischt und je 200 μ l der Lösung in einem Well eines 8-Well μ -slides polymerisiert. Zur Visualisierung der Färbung wurden Z-Stacks (Höhe 300 μ m, Schrittgröße 5 μ m) mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Leica TCS SPE) aufgezeichnet. Die 3D Rekonstruktion der Z-Stacks ist in Abbildung 93 gezeigt.

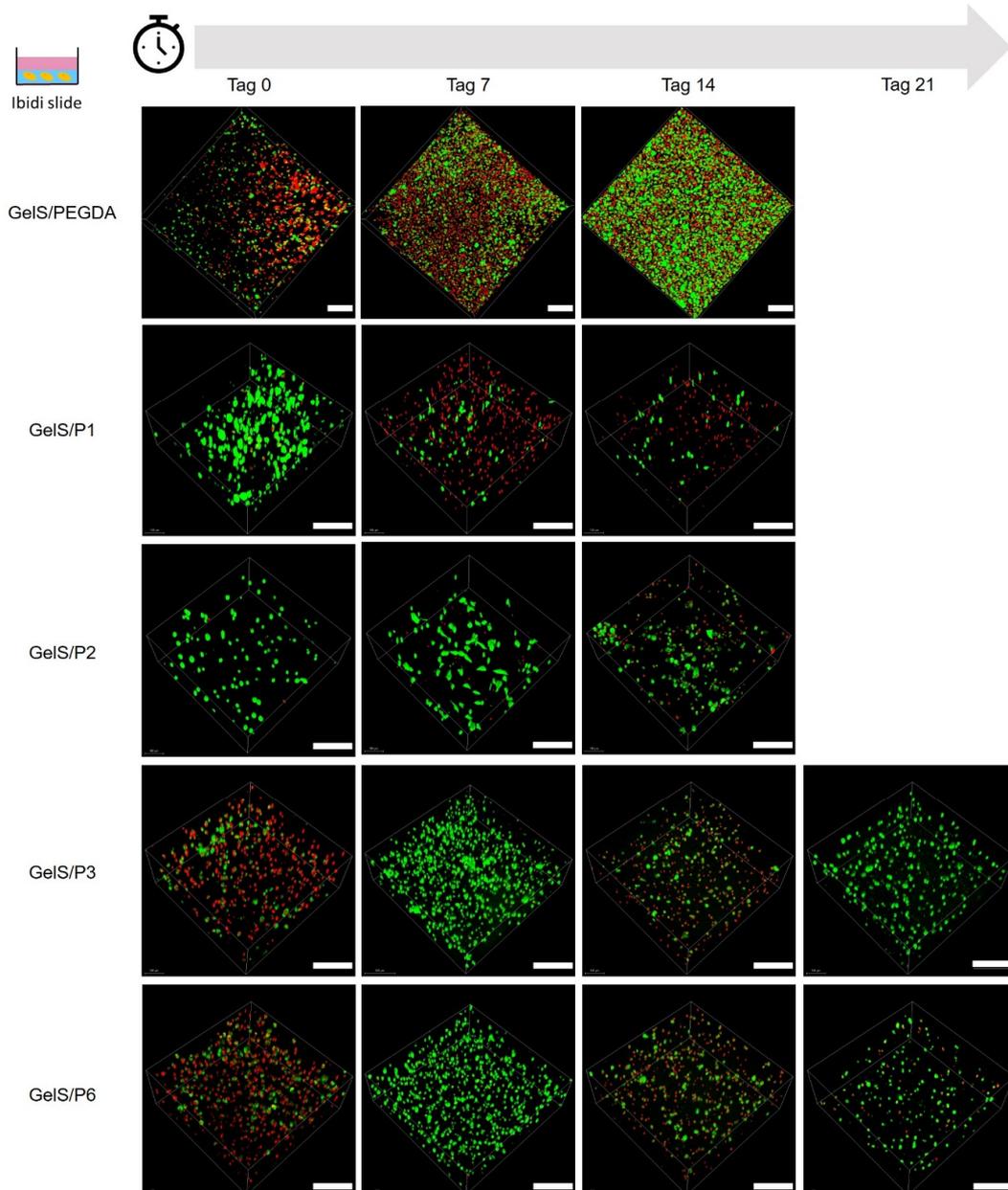


Abbildung 93: Lebend-Tot-Färbung von in Hydrogelen mit Vernetzer eingekapselten NHDF im 8-Well μ -slide zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 0, Tag 7, Tag 14, Tag 21). Die Färbung erfolgte mit Calcein-AM und PI und wurde mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica TCS SPE, 10x Objektiv, Zoom 1,5, grün Ex. 488 nm, Em. 495-584 nm; rot Ex. 532 nm, Em. 610-700 nm) visualisiert. Es wurden Z-Stacks mit einer Höhe von 300 μ m aufgezeichnet (Schrittgröße 5 μ m). Die Rekonstruktion der Z-Stacks zur 3D Anordnung erfolgte mit der Software Leica LasX. Maßstab 200 μ m.

An Tag 0 konnten in allen Hydrogelen grün fluoreszierende NHDF detektiert werden, wobei der Anteil in GelS/P3 und GelS/P6 sehr gering war. Nach 7 Tagen Inkubation bei

Zellkulturbedingungen wiesen alle Hydrogele außer GelS/P1 einen hohen Anteil grün fluoreszierender NHDF auf. Nach 14 Tagen Inkubation nahm der Anteil nekrotischer Zellen in allen Gelen zu, eine weitere Kultivierung war nur für GelS/P3 und GelS/P6 möglich. In keinem Hydrogel konnte eine Adhäsion und Elongation der NHDF beobachtet werden. Entgegen der Erwartung, dass das Gelatine-Rückgrat der Gele ausreichen RGD-Domänen für eine Adhäsion zur Verfügung stellt, fand keine Elongation der NHDF statt. Da die Gele im μ -slide von sehr wenig Medium umgeben waren und das Quellen auch für die Gele mit NHDF ein Mediumwechsel ab Tag 7 nicht mehr zuließ, war die fehlende Ausrichtung möglicherweise auf einen Nährstoffmangel zurückzuführen. Entgegen der Erwartung zeigten die Lebend-Tot-Färbungen der eingekapselten NHDF jedoch einen höheren Anteil grün fluoreszierender Zellen als die eingekapselten HepG2. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die mechanischen Eigenschaften der Hydrogele mit Vernetzer besser zu den *in vivo* Umgebungen von NHDF passen als zu der Umgebung von HepG2, die nicht in einem gesunden, sondern malignen Gewebeverband vorkommen. Die Tiefenfärbung zur Bestätigung der 3D Verteilung ist in Abbildung 116 (Anhang) gezeigt. Die Betrachtung der Viabilität reicht jedoch nicht aus um eine Aussage über die Biokompatibilität eines Materials zu treffen. Als weitere Beurteilungsgrundlage wurde die Proliferation der eingekapselten Zellen quantifiziert.

4.3.3 Proliferation von eingekapselten HepG2 und NHDF

Zur Quantifizierung der Proliferation der Zellen in den Hydrogelen mit Vernetzer wurden Hydrogele mit HepG2 und NHDF ($2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) in einer 96-Well Platte (100 μ L/Well) hergestellt und mit Medium überschichtet.²²⁴ Als Blank wurden zusätzlich Gele ohne Zellen hergestellt. Die Gele wurden unter Zellkulturbedingungen inkubiert und an Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 mit dem PrestoBlue Reagenz zur Bestimmung der Proliferation gefärbt. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Gele mit DPBS⁻ gewaschen und anschließend für 2 Stunden mit PrestoBlue 1:10 in DMEM gefärbt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Fluoreszenz mit einem Platten-Photometer gemessen (SpectraMax ID3, Molecular Devices). Das PrestoBlue Reagenz wird von metabolisch aktiven Zellen in den fluoreszierenden Farbstoff Resorufin reduziert, die Zunahme der Fluoreszenz hängt direkt mit der Zunahme der Zellzahl zusammen.²³⁹ Die gemessenen Fluoreszenzen sind in Abbildung 94 ((A) HepG2, (B) NHDF). Die in GelS/PEGDA eingekapselten HepG2 zeigten keine Zunahme der Fluoreszenz und somit keine Proliferation über den gesamten Kultivierungszeitraum. Dies deckte sich mit den Beobachtungen aus der Lebend-Tot-Färbung. Für alle Gele konnte ein Fluoreszenzabfall von Tag 0 auf Tag 7 beobachtet werden. Da die Gele an Tag 0 lediglich 30 min inkubiert wurden, bevor sie gefärbt wurden, fand bis Tag 7 durch das Quellen der Gele eine Verdünnung statt, welche sich an Tag 7 in der Fluoreszenzabnahme zeigte. Die Färbung an Tag 14 zeigte eine ähnliche Fluoreszenz für alle Gele mit Peptoiden als Vernetzer. Da die Fluoreszenz an Tag 0 trotz gleicher eingesetzter Zellzahl nicht den selben Wert für alle Gele zeigte, wurde die

Zunahme der Fluoreszenz relativ zu Tag 0 betrachtet. Die größte Zunahme von über 60 % bis Tag 14 zeigte sich für HepG2 in GelS/P6, dies deckte sich nicht mit der Beobachtung aus der Lebend-Tot-Färbung. Geringe Zunahmen von unter 20 % wurden für GelS/P1 und GelS/P3 detektiert. Für GelS/P2 konnte bis Tag 14 keine Zunahme der Fluoreszenz detektiert werden. Nach Tag 14 nahmen die Fluoreszenzen aller Gele ab. Insgesamt konnte nur eine niedrige Proliferation ermittelt werden, was sich im Großen und Ganzen mit den Viabilitäten deckte.

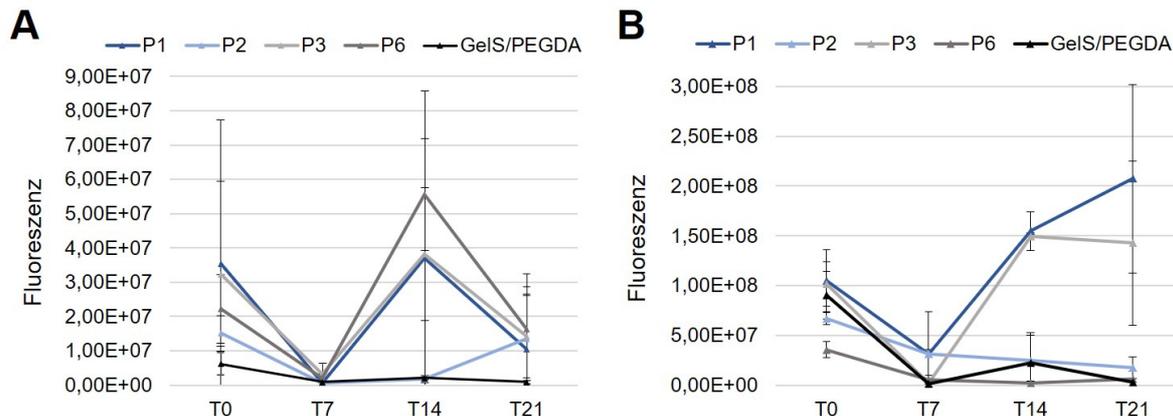


Abbildung 94: Ergebnisse des PrestoBlue Assays für in Hydrogele mit Vernetzer eingekapselte HepG2 (A) und NHDF (B). Die Zellen wurden in die Hydrogele eingekapselt und an Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 der PrestoBlue Assay durchgeführt. Die Fluoreszenz ist direkt zusammenhängend mit der Proliferation, da nur metabolisch aktive Zellen das PrestoBlue Reagenz in den fluoreszenten Farbstoff umbauen. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten, die Berechnung des Mittelwertes mit $n=3$, die der Standardabweichung mit $n-1$.

Der Eindruck, dass die NHDF in den Gelen höhere Viabilitäten zeigten, konnte durch den PrestoBlue Assay bestätigt werden. Lediglich für GelS/PEGDA konnte keine Fluoreszenzzunahme über den gesamten Zeitraum detektiert werden. Die stärksten Fluoreszenzzunahmen um 100 % und 40 % zeigten GelS/P1 und GelS/P3. Für GelS/P2 wurde eine kontinuierliche Abnahme detektiert, ebenso für GelS/P6. Wie schon für die eingekapselten HepG2 fiel auch die Fluoreszenz an Tag 7 ab, was ebenfalls auf das Quellen der Gele zurückzuführen war. Mit dem PrestoBlue Assay konnten die Ergebnisse aus der Lebend-Tot-Färbung im Wesentlichen bestätigt werden. Die Gele ermöglichen es Zellen zu proliferieren und in den Gelen eingekapselt kultiviert zu werden. Besonders vorteilhaft erwies sich, dass sich Primärzellen in den Gelen besser kultivieren lassen als Krebszellen, wodurch sich eine Eignung als Matrix für die 3D Zellkultur abzeichnete. Es war jedoch zu beobachten, dass sich die NHDF in den Gelen, die im 8-Well μ -slide kultiviert wurden, nicht ausrichteten. Da die Gele stark aufquellen, war nach einiger Zeit die Zufuhr von frischem DMEM stark beeinträchtigt, die Gele wurden nur noch auf der Oberseite mit frischem Medium versorgt. Um dies zu umgehen, wurden die Gele nach dem Polymerisieren entnommen und in eine Multiwell Platte überführt.

4.3.4 Kultivierung von eingekapselten NHDF in einer Multiwell Platte

In Zusammenarbeit mit den Masterstudentinnen Sonja Leopold und Johanna Wien wurden NHDF in Hydrogele mit Vernetzer eingebettet und zur Kultivierung in eine 24-Well Platte überführt.^{223,224} Für die Kultivierung der Hydrogele in einer 24-Well Platte wurden $2,5 \times 10^6$ NHDF/ml in der Hydrogelvorläuferlösung resuspendiert und je 200 μ L in einem Well eines 8-Well μ -slides gegeben. Die Lösungen wurden mit dem Omnicure S2000 zum Hydrogel polymerisiert, mit einem Spatel aus dem μ -slide entnommen und in eine 24-Well Platte überführt. Zu jedem Gel wurden 700 μ l DMEM gegeben und die Platte bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Vorgehen ist in Abbildung 95 schematisch dargestellt.

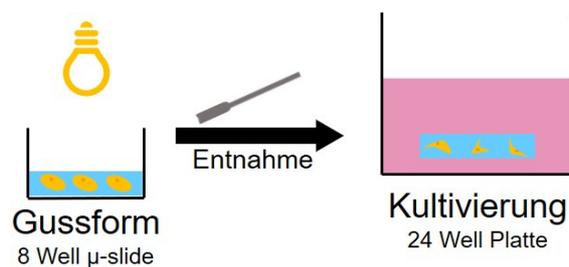


Abbildung 95: Schematische Darstellung der Herstellung von Hydrogelen mit eingekapselten Zellen zur Kultivierung in 24-Well Platten. Die Gele wurden nach der Polymerisation aus der Gussform entnommen und in eine 24-Well Platte überführt, wodurch sie in drei Dimensionen von Zellkulturmedium umgeben waren.

Im Gegensatz zur Kultivierung im μ -slide hatten die Hydrogele bei der Kultivierung in der 24-Well Platte keine Verbindung zu einer festen Oberfläche, sie wurden aus allen Richtungen von DMEM umspült. Dadurch wurden die Gele aus allen Raumrichtungen versorgt. Das Medium konnte auch mit zunehmender Kultivierungszeit vollständig ausgetauscht werden. Um die Kultivierung in der 24-Well Platte mit der im μ -slide zu vergleichen, wurde eine Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM (4 μ M) und PI (0,02 mg/ml) an Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 durchgeführt und mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5) visualisiert. Die aufgezeichneten Z-Stacks sind in Abbildung 96 gezeigt. Die in Gels/PEGDA eingekapselten NHDF zeigten über 21 Tage einen ausgewogenen Anteil grün fluoreszierender viableler und rot fluoreszierender nekrotischer Zellen, die Zellzahl nahm jedoch mit der Zeit ab. Eine Elongation der NHDF konnte nicht erkannt werden. Möglicherweise wirkte sich der Vernetzer PEGDA bereits während des Herstellungsprozesses negativ auf die Zellen aus, sodass deren Funktion stark beeinträchtigt war. NHDF, die in Gels/P1 eingekapselt wurden, zeigten bereits an Tag 7 eine Ausrichtung bei der Kultivierung in der 24-Well Platte. Bis Tag 14 war eine starke Bildung von Zell-Zell-Kontakten zu detektieren, die sich bis Tag 21 noch verstärkte. Für Gels/P1 konnte durch die Kultivierung der Hydrogele in einer Multiwell Platte eine Ausrichtung und Bildung von Zell-Zell-Kontakten der NHDF erreicht werden. Da es sich bei NHDF um ortsständige Zellen des Bindegewebes handelt, wurde sowohl die Ausrichtung, als auch die

Netzwerkbildung als Indikator für eine Funktionalität der NHDF gesehen. In GelS/P2 zeigte sich eine erste Ausrichtung der NHDF erst an Tag 14. An Tag 21 konnte eine starke Bildung von Zell-Zell-Kontakten detektiert werden, die NHDF erschienen als grün fluoreszierender Layer, einzelne Zellen konnten nicht mehr erkannt werden. Die Vernetzer P1 und P2 unterschieden sich nur ihren Seitenketten. Die Seitenketten von P1 ähneln der Aminosäure Lysin, die Seitenketten von P2 sind gegenüber den Seitenketten von P1 um zwei Kohlenstoffatome verkürzt. Ob die Seitenketten die Elongation der NHDF maßgeblich beeinflussen, konnte nicht abschließend geklärt werden. Es fiel jedoch auf, dass in GelS/P3 keine kontinuierliche Elongation und keine Bildung von Zell-Zell-Kontakten erreicht werden konnte. Da es sich bei P3 um ein Hexamer handelte, war die Seitenkette „Lysin“ viermal vorhanden. Möglicherweise beeinflusst das häufigere Vorkommen dieser Seitenkette in Kombination mit dem verlängerten Vernetzer gegenüber P1 und P2 die NHDF negativ. Ein toxischer Einfluss wurde auf Grund der starken Verdünnung durch die große Menge DMEM und dem hohen Anteil grün fluoreszierender Zellen ausgeschlossen. In GelS/P6 eingekapselte NHDF zeigten ebenfalls keinen Unterschied in Viabilität, Elongation und Netzwerkbildung zur Kultivierung im μ -slide.

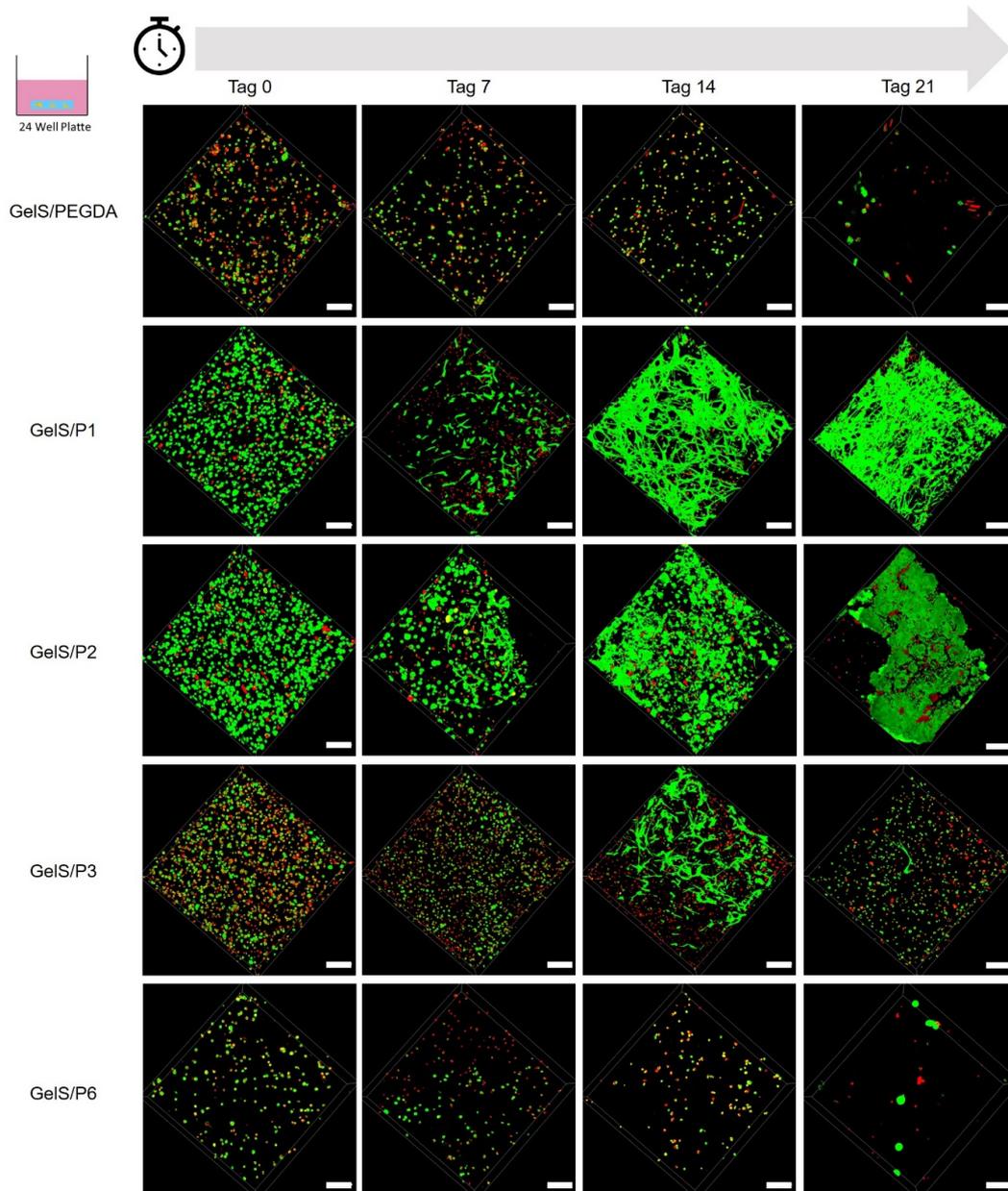


Abbildung 96: Lebend-Tot-Färbung von in Hydrogelen mit Vernetzer eingekapselten NHDF in einer 24-well Platte zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 0, Tag 7, Tag 14, Tag 21). Die Färbung erfolgte mit Calcein-AM (grün) und PI (rot) und wurde mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5, 10x Objektiv, Zoom 1,0, grün Ex. 494 nm, Em. 499-544 nm; rot Ex. 549 nm, Em. 591-725 nm) visualisiert. Es wurden Z-Stacks mit einer Höhe von 300 μm aufgezeichnet (Schrittgröße 5 μm). Die Rekonstruktion der Z-Stacks zur 3D Anordnung erfolgte mit der Software Leica LasX. Maßstab 200 μm .

Durch die Kultivierung in der 24-Well Platte konnten Unterschiede zwischen den einzelnen Vernetzern deutlich erkannt werden. Durch die große Menge Medium, die in den Wells vorhanden war, konnten toxische Effekte und Nährstoffmangel ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurde verhindert, dass die Hydrogele einen starken Kontakt zu einer festen Oberfläche hatten. Die Gele wurden von allen Seiten mit Medium umspült, dies bildet die *in vivo* Gegebenheiten besser ab, als die Kultivierung im μ -slide. Für alle Gele war eine Kultivierung über 21 Tage möglich, es zeigten sich jedoch Unterschiede in der Stabilität der Gele und der 3D Verteilung der Zellen in den Gelen (Abbildung 117, Anhang). Um zu

untersuchen, wie sich die Zellen in den Gelen bei längerer Kultivierungsdauer verhalten und ob auch für die Gele GelS/P3 und GelS/P6 eine Ausrichtung der NHDF durch Verlängerung der Kultivierungsdauer erreicht werden kann, wurden NHDF in die Gele eingekapselt und in einer 24-Well Platte für 35 Tage kultiviert.

4.3.4.1 Kultivierung länger als 21 Tage

Die Hydrogele wurden analog zu der Kultivierung in der 24-Well Platte hergestellt und kultiviert. An Tag 28 und Tag 35 wurde eine Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM (4 μ M) und PI (0,02 mg/ml) durchgeführt und mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 97 gezeigt.

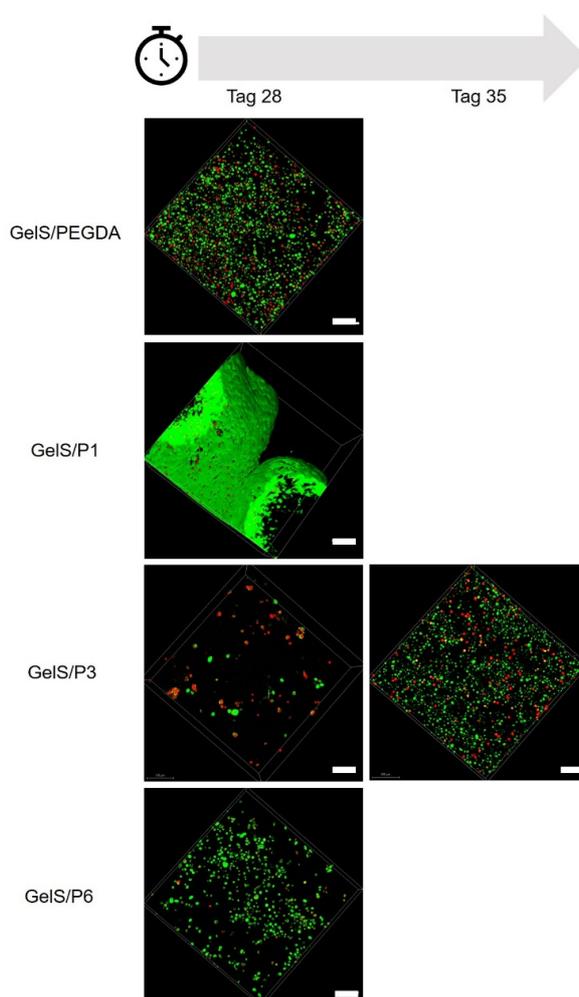


Abbildung 97: Lebend-Tot-Färbung von in Hydrogelen mit Vernetzer eingekapselten NHDF in einer 24-well Platte zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 28, Tag 35). Die Färbung erfolgte mit Calcein-AM (grün) und PI (rot) und wurde mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5, 10x Objektiv, Zoom 1,5, grün Ex. 494 nm, Em. 499-544 nm; rot Ex. 549 nm, Em. 591-725 nm) visualisiert. Es wurden Z-Stacks mit einer Höhe von 300 μ m aufgezeichnet (Schrittgröße 5 μ m). Die Rekonstruktion der Z-Stacks zur 3D Anordnung erfolgte mit der Software Leica LasX. Maßstab 200 μ m.

Eine Kultivierung von GelS/P2 war nicht über Tag 21 hinaus möglich, dies zeichnete sich bereits durch die hohe Zelldichte an Tag 21 ab. GelS/PEGDA konnte bis Tag 28 kultiviert

werden, es zeigte sich jedoch auch dann keine Ausrichtung der NHDF. Ursächlich hierfür könnte sein, dass der sehr lange Vernetzer PEGDA die Gelatineketten in zu großer Entfernung vernetzt. Die NHDF können dann an der Gelatine adhären, sich jedoch nicht zwischen verschiedenen Gelatineketten ausstrecken. Eine Färbung an Tag 35 war nicht mehr möglich. Die in GelS/P1 eingekapselten NHDF zeigten an Tag 28 sehr viele Zell-Zell-Kontakte, es konnten keine einzelnen Zellen mehr erkannt werden. Durch die große Anzahl Zellen war auch in GelS/P1 keine Kultivierung bis Tag 35 möglich. Für GelS/P3 konnte auch mit Verlängerung des Kultivierungszeitraumes keine Ausrichtung der Zellen erreicht werden. Möglicherweise spielte hierbei die Länge des Vernetzers ebenfalls eine Rolle, sodass bereits das Hexamer P3 als Vernetzer zu lang war und eine Elongation der NHDF verhinderte. Der gleiche Effekt zeigte sich auch für P6. Hier konnte auch an Tag 28 keine Ausrichtung der NHDF festgestellt werden, eine Kultivierung bis Tag 35 war nicht möglich. Die Kultivierung der NHDF in den Hydrogelen mit Vernetzer wird durch den verwendeten Vernetzer stark beeinflusst. Zum einen durch dessen Länge, zum anderen durch die Seitenketten der Peptoide. Für tetramere Vernetzer konnte eine Ausrichtung der NHDF beobachtet werden, wobei diese schneller zu beobachten war, wenn die Seitenketten des Peptoids kurz waren. Für sehr kurze und lange Peptoide konnte keine Ausrichtung erreicht werden. Besonders für lange Vernetzer könnte hier ursächlich sein, dass nur das Rückgrat der Gelatine über Adhäsionsdomänen verfügt. Durch den langen Vernetzer könnte so verhindert worden sein, dass die NHDF gleichzeitig an mehreren Adhäsionsdomänen adhären konnten und sich nicht ausrichteten. Um eine genauere Aussage über den Einfluss von Länge und Seitenketten treffen zu können, müssten noch weitere Peptoide unterschiedlicher Sequenz und Länge als Vernetzer untersucht werden. Eine grundsätzliche Eignung von Peptoiden als Vernetzer für funktionalisierte Gelatine wurde deutlich. Da der Aufbau von Gewebemodellen reproduzierbar und präzise sein muss, rückte in den letzten Jahren der 3D Biodruck vermehrt in den Fokus des *Tissue Engineering*.

4.4 3D Biodruck

Mit dem 3D Biodruck werden Materialien und Zellen spatio-temporal zu definierten Strukturen verarbeitet.^{2,6} Gelatine-basierte Hydrogele eignen sich auf Grund ihrer durch Temperatur beeinflussbaren Viskosität gut für den Einsatz im extrusionsbasierten 3D Biodruck (Kapitel 3.5, Abbildung 52). Zur Evaluierung der Eignung von Hydrogelen mit Vernetzern wurde GelS/P1 als Biotinte genutzt. Es wurden zunächst die viskoelastischen Eigenschaften der Lösungen bestimmt, um einen eventuellen Einfluss des Vernetzer auf die Viskosität zu ermitteln.

4.4.1 Viskoelastische Eigenschaften

Um zu untersuchen, ob der Vernetzer die Zusammenlagerung der Gelatinehelices beeinflusst, wurden zunächst in einer Oszillationsmessung über einen Frequenzbereich von 0,1-100 rad/s an einem Platte-Platte-Rheometer (HAAKE Rheoscope, Thermo Fisher Scientific, PP20 Messplatte, Messspalt 1mm) die viskoelastischen Eigenschaften Speichermodul G' und Verlustmodul G'' der Hydrogelvorläuferlösung bei 14 °C bestimmt. Die Ergebnisse der Messung sind in Abbildung 98A gezeigt. GelS/PEGDA wurde als Vergleich genutzt, da sich PEGDA signifikant in der Länge von P1 unterscheidet. Für beide Lösungen lagen die gemessenen Werte für den Speichermodul über denen des Verlustmoduls. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Lösungen gelieren und bei 14 °C ein Feststoffverhalten zeigen. Aus den gemessenen Werten wurden die Plateau-Speichermodule bestimmt (Abbildung 98B). Der Speichermodul für GelS/PEGDA betrug 800 Pa und war damit höher als der für GelS/P1 gemessene Speichermodul von 590 Pa. Dadurch zeigte sich, dass die Länge des Vernetzer die Zusammenlagerung der Triplehelices nicht stört. Inwiefern die Seitenketten des Peptoids die Zusammenlagerung beeinflussen und ob Peptoide diese generell stören muss noch durch weitere Experimente geklärt werden. Für den extrusionsbasierten 3D Druck spielt vor allem die Viskosität eine große Rolle. Die Biotinte muss eine Viskosität aufweisen, die der Tinte bis zur lichtinduzierten Vernetzung eine gute Formstabilität verleiht. Zusätzlich muss die Tinte ein scherverdünnendes Verhalten zeigen, damit diese durch die Dosiernadel extrudiert werden kann und die enthaltenen Zellen nicht geschädigt werden. Beim scherverdünnenden Verhalten sinkt die Viskosität einer Lösung mit zunehmender Scherrate. Dies vermindert den Scherstress, der während der Extrusion auf die Zellen in der Biotinte wirkt.³⁷ In Abbildung 98C sind die Ergebnisse des Rotationsversuchs zu Scherviskositätsmessung am Platte-Platte-Rheometer (HAAKE Rheoscope, Thermo Fisher Scientific, PP20 Messplatte, Messspalt 1mm) gezeigt. Die Messung erfolgte über einen Scherratenbereich von 0,1-1000 s⁻¹.

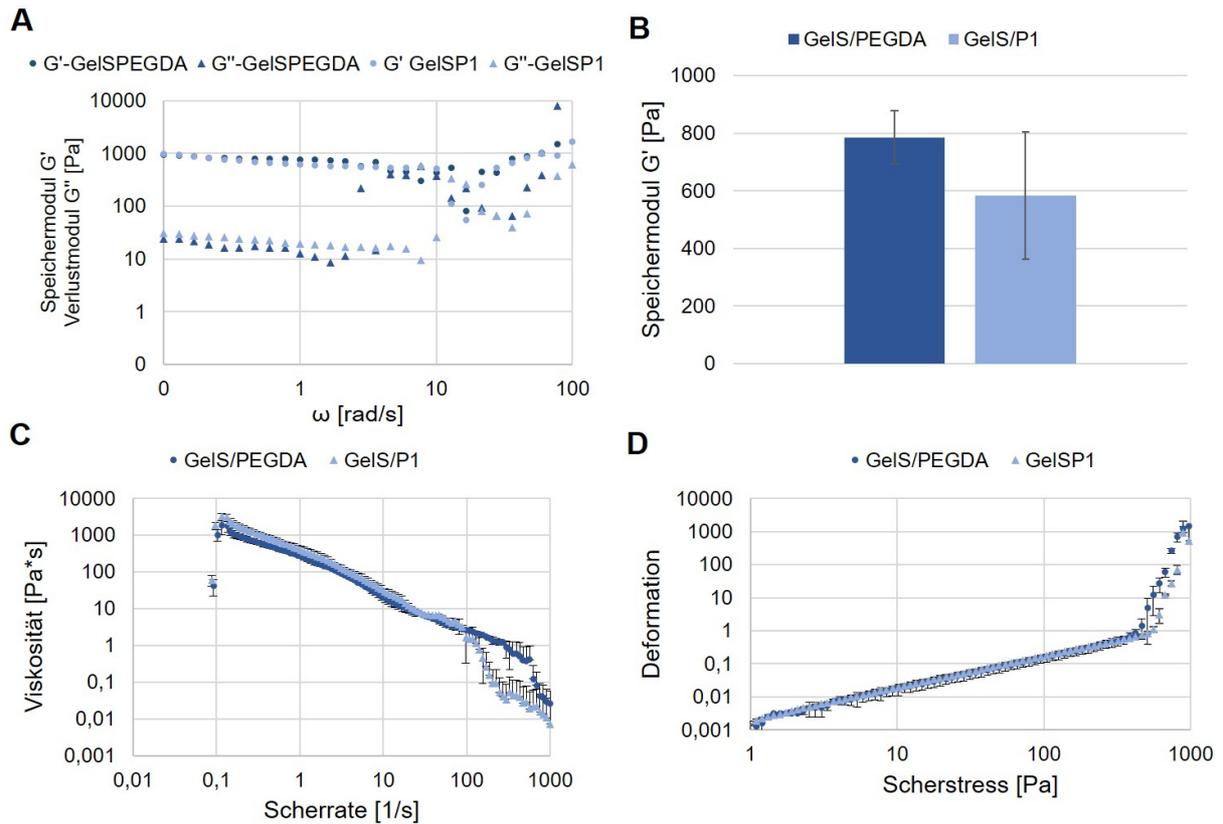


Abbildung 98: Viskoelastische Eigenschaften von Gels/P1 und Gels/PEGDA bei 14 °C. An einem Platte-Platte Rheometer wurden die viskoelastischen Eigenschaften, die Scherviskosität und die Fließgrenze von GelS/P1 (5 % GelS, 3,5 mM P1, 0,3 % LAP) und GelS/PEGDA (5 % GelS, 3,5 mM PEGDA, 0,3 % LAP) Lösungen bei 14 °C bestimmt. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten, die Berechnung des Mittelwertes mit $n=3$, die der Standardabweichung mit $n-1$. (A) Daten der Oszillationsmessung, (B) Plateau-Speichermodule, (C) Scherviskosität, (D) Fließgrenze.

Sowohl GelS/PEGDA als auch GelS/P1 zeigten eine Abnahme der Viskosität mit zunehmender Scherrate. Ein deutlicher Unterschied war nicht zu detektieren. Im in Abbildung 98D gezeigten Deformationsprofil für die beiden Lösungen konnte ebenfalls kein Unterschied festgestellt werden, sodass ein starker Einfluss des Vernetzers auf den Druckvorgang ausgeschlossen wurde. GelS/P1 war theoretisch für den extrusionsbasierten 3D Biodruck geeignet. Da GelS/P1 bei niedrigen Temperaturen physikalisch geliert, wurde zunächst die optimale Drucktemperatur bestimmt.

4.4.2 Drucktemperatur

Zur Bestimmung der Drucktemperatur wurde die Hydrogelvorläuferlösung (5 % GelS, 3,5 mM P1, 0,1 % LAP) in eine 3 ml Spritze mit Luer-Lock-Anschluss überführt und für 10 min bei 4 °C gelagert. Die Spritze wurde anschließend in den Extrusionsdruckkopf des Biodruckers BioSpot BP eingesetzt und auf die gewünschte Temperatur gebracht. Nach Erreichen der Temperatur wurde eine Gitterstruktur gedruckt. Die gedruckten Strukturen sind in Abbildung 99 gezeigt.

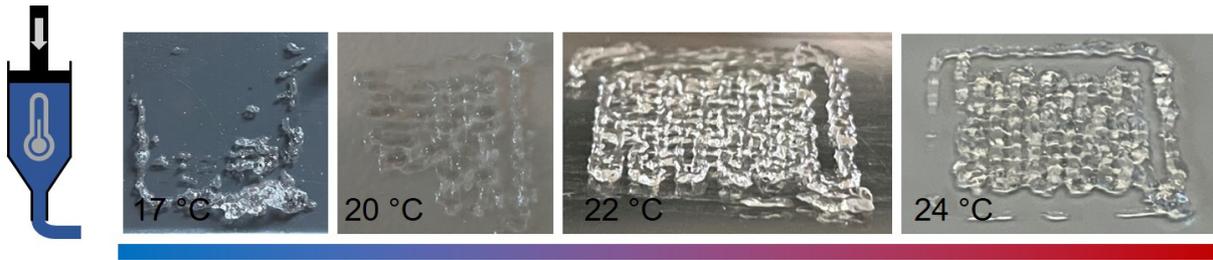


Abbildung 99: Für die Biotinte GelS/P1 (5 % GelS, 3,5 mM P1, 0,3 % LAP) wurde die optimale Drucktemperatur bestimmt. Die Tinte wurde auf unterschiedliche Temperaturen (17 °C, 20 °C, 22 °C, 24 °C) gebracht und Gitterstrukturen mit dem BioSpot BP gedruckt. Es wurde eine konische Dosiernadel mit einem ID von 250 μm verwendet. Als optimale Drucktemperatur wurden 22 °C bestimmt.

Für eine Drucktemperatur von 17 °C konnte keine gleichmäßige Extrusion erreicht werden, die Tinte wies eine inhomogene, bröckelige Struktur auf. Durch Erhöhung der Drucktemperatur auf 20 °C konnte eine homogenere Tintenstruktur erreicht werden, jedoch nicht ausreichend um eine vollständige Gitterstruktur aufbauen zu können. Eine weitere Erhöhung auf 22 °C führte zu einer Beschaffenheit der Biotinte, die ein Drucken einer vollständigen, gut aufgelösten Gitterstruktur zuließ. In einem weiteren Schritt wurden NHDF der Hydrogelvorläuferlösung hinzugefügt und die zellhaltige Biotinte zu Gitterstrukturen verdruckt.

4.4.3 NHDF

Zum Druck von Gitterstrukturen mit Zellen wurden $2,5 \times 10^6$ NHDF/ml in der Hydrogelvorläuferlösung resuspendiert und die Lösung in eine 3 ml Spritze überführt.²²⁴ Die Biotinte wurde in der Spritze auf RT abgekühlt und in den Druckkopf eingesetzt. Die Biotinte wurde im Druckkopf auf 22 °C temperiert und der Druckvorgang gestartet. Als Extrusion wurde 0,02 mm/s gewählt, eine Optimierung fand nicht statt. Jede Schicht wurde nach Beendigung des Druckes mit dem Omnicure S2000 polymerisiert (320-500 nm, 1000 mW/cm², 10 s). Nach dem Druckvorgang wurde der Objektträger aus dem Druckbett in eine Petrischale überführt und mit DPBS^{-/-} gewaschen. Das DPBS^{-/-} wurde abgenommen und die Struktur mit DMEM überschichtet. Eine Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM (4 μM) und PI (0,02 mg/ml) wurde direkt nach dem Druckvorgang und an Tag 7 durchgeführt. Für die Färbung wurde das Medium abgenommen und je 500 μL Färbelösung auf die Struktur gegeben. Nach der Inkubationszeit von 25 min wurde die Struktur mit DPBS^{-/-} gewaschen und die Färbung mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5) visualisiert. Die aufgezeichneten Z-Stacks sind in Abbildung 100 gezeigt. Die Färbung an Tag 0 zeigte einen großen Anteil grün fluoreszierender NHDF. An Tag 7 konnten noch einmal deutlich mehr grün fluoreszierende NHDF detektiert werden, womit gezeigt war, dass der Druckvorgang in GelS/P1 die Zellen nicht negativ beeinflusst. Auch die lange Exposition der Zellen mit der Tinte zeigten sich nicht problematisch. Die aus der Lebend-Tot-Färbung erstellte Tiefenfärbung zeigte eine gleichmäßige 3D Verteilung der NHDF zu beiden Zeitpunkten.

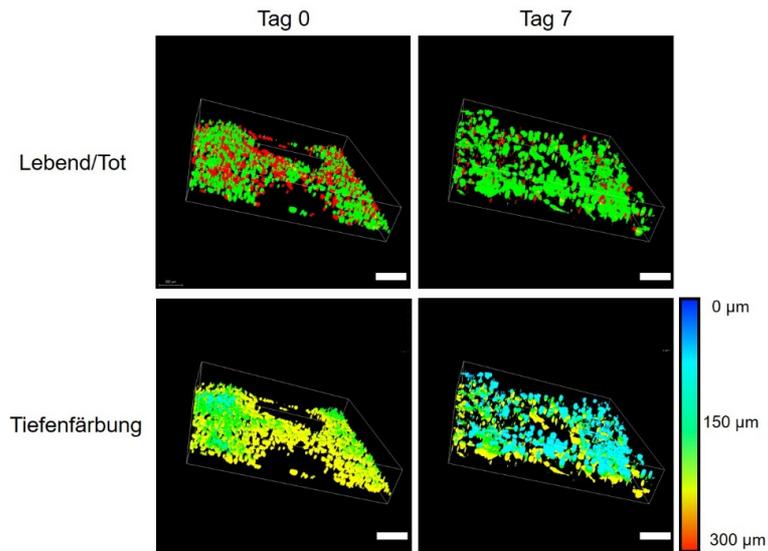


Abbildung 100: Lebend-Tot-Färbung von NHDF, die in GelS/P1 zu Gitterstrukturen mit dem BioSpot BP verdruckt wurden. An Tag 0 und Tag 7 wurde eine Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM (grün) und PI (rot) durchgeführt und mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5, 10x Objektiv, Zoom 1,5, grün Ex. 494 nm, Em. 499-544 nm; rot Ex. 549 nm, Em. 591-725 nm) visualisiert. Es wurden Z-Stack der Höhe 300 μm in 5 μm Schritten aufgenommen. Maßstab 200 μm .

4.5 Zusammenfassung Teil II – Hydrogele mit Vernetzer

In diesem Teil der Arbeit wurde evaluiert, ob sich Peptide als Vernetzer für funktionalisierte Gelatine eignen. Peptide zeigen gegenüber Proteasen eine hohe Stabilität und sind bereits als molekulare Transporter für den spezifischen Wirkstofftransport gut untersucht.^{226,229} Besonders für wasserlösliche Peptide ist bekannt, dass sie in geringen Konzentrationen gut biokompatibel sind. Damit Peptide als Vernetzer eingesetzt werden können, wurde zunächst festgestellt, dass diese auch in Konzentrationen über 1 mM zellverträglich sind. Um thiolierte Gelatine mit Peptiden zum Hydrogel zu vernetzen wurden zunächst die optimalen Aushärtungsbedingungen bestimmt, mit welchen sich die Gele unter milden Bedingungen polymerisieren ließen. Für die polymerisierten Gele wurden in weiteren Schritten die Quell- und Abbaueigenschaften analysiert. Um auszuschließen, dass Abbauprodukte der Gele, die während der Kultivierung mit und ohne Zellen entstehen, toxisch auf Zellen wirken, wurden diese hinsichtlich ihrer toxischen Wirkung analysiert und als nicht-toxisch bestimmt. Durch Bestimmung des Speichermodulus G' für die polymerisierten Hydrogele bei 37 °C konnte festgestellt werden, dass sich dieser durch den Vernetzer beeinflussen lässt und so kontrolliert werden kann. Nach der erfolgten Charakterisierung wurden zunächst humane Leberkrebszellen in die Gele eingebettet um die Biokompatibilität durch die Viabilität der eingebetteten Zellen zu beurteilen. Für die Leberkrebszellen erwiesen sich die untersuchten Peptide nicht als geeignete Vernetzer. Die später eingebetteten NHDF zeigten deutlich höhere Viabilitäten. Durch eine Anpassung der Kultivierungsmethode konnte gezeigt werden, dass NHDF in GelS/P1 und GelS/P2 eine Ausrichtung und Netzwerkbildung zeigten. Eine erfolgreiche Kultivierung für Zeiträume >21 Tage konnte nur für GelS/P1 durchgeführt werden. Abschließend wurde GelS/P1 exemplarisch auf die Eignung für den extrusionsbasierten 3D Biodruck getestet. Hierzu wurden zunächst die viskoelastischen Eigenschaften bestimmt und das benötigte scherverdünnende Verhalten nachgewiesen. Nach der Bestimmung der optimalen Drucktemperatur wurden NHDF in GelS/P1 in Gitterstrukturen verdrückt. Durch eine Lebend-Tot-Färbung konnten nach dem Druckvorgang hohe Viabilitäten nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurde das Hydrogel GelS mit PEGDA als Vernetzer verwendet. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass sich Peptide besser als Vernetzer eignen als PEGDA, durch ihre einfache Synthese lassen sich schnell viele verschiedene Vernetzer herstellen. Die Eigenschaften der Hydrogele lassen sich durch den verwendeten Vernetzer beeinflussen, ein endgültiger Zusammenhang zwischen zum Beispiel der Länge oder der Sequenz des Vernetzers konnte noch nicht festgestellt werden.

5 Diskussion

Für die Generierung von artifiziellen Geweben spielt das eingesetzte Material eine entscheidende Rolle.^{6,39} Das Material muss nicht nur eine Stützfunktion ausüben und die mechanische Stabilität gewährleisten, sondern auch den enthaltenen Zellen die Proliferation, Migration und Differenzierung ermöglichen.⁴ Soll der Aufbau des Gewebes mit einer 3D Biodrucktechnologie ausgeführt werden, muss das Material, die sogenannte Biotinte, zusätzlich die Anforderungen des Druckprozesses erfüllen. Das Material muss also die *in vivo* Eigenschaften der ECM nachbilden, aber auch die für den Druckprozess wichtigen rheologischen und mechanischen Eigenschaften aufweisen. Je nach Drucktechnologie können sich diese Anforderungen unterscheiden.²¹ Im extrusionsbasierten 3D Biodruck werden zum Beispiel hochviskose Materialien benötigt um die Formstabilität bis zur Vernetzung zu ermöglichen.^{66,240} Beim DLW hingegen sollte das Material eine niedrige Viskosität und hohe Transparenz aufweisen.^{66,68} Die genannten Eigenschaften in einem Material zu vereinen stellt Forscher seit langer Zeit vor eine große Herausforderung. Mit den Jahren hat sich jedoch gezeigt, dass Hydrogele viele dieser Anforderungen erfüllen und besonders Gelatine-basierte Hydrogele gut für die Anwendung im *Tissue Engineering* geeignet sind.^{160,162} Gelatine wird aus Bestandteilen der natürlichen ECM gewonnen und besitzt deshalb eine intrinsische biologische Funktion. Hierzu gehören unter anderem die unabdingbaren Zellinteraktionsdomänen, wie die RGD-Domäne sowie Protease-Schnittstellen, welche die Gelatine vollständig bioabbaubar machen.¹⁵² Gelatine ist unter physiologischen Bedingungen jedoch nicht stabil, da die für die Stabilität sorgende Kettenverstrickung bei 37 °C nicht stabil ist. Aus diesem Grund ist reine Gelatine nicht für den Einsatz unter Zellkulturbedingungen geeignet. Um das Problem der Instabilität zu lösen, kann Gelatine an ihren Seitenketten chemisch modifiziert werden. Durch das Einbringen von photoreaktiven Gruppen wird eine lichtinduzierte kovalente Vernetzung ermöglicht.^{99,119}

Eine breite Anwendung im *Tissue Engineering* findet das Hydrogel GelMA. Durch Funktionalisierung von Gelatine mit Methacrylatgruppen können Hydrogele gebildet werden, die sich lichtinduziert vernetzen lassen.^{119,241,242} Durch die Anpassung des Funktionalisierungsgrades kann die Festigkeit des Materials beeinflusst werden und direkt an die Anforderungen des zu bildenden Gewebes angepasst werden.¹²¹ In diesem Projekt wurden drei verschiedene GelMA-Photopolymere synthetisiert, die sich zu Hydrogelen mit verschiedenen Festigkeiten vernetzen ließen. Durch die Umsetzung von Gelatine mit Methacrylsäureanhydrid wurden Photopolymere mit verschiedenen Funktionalisierungsgraden erhalten. GelMA1.0 wies einen Funktionalisierungsgrad von 36 % auf, GelMA8.0 war zu 67 % funktionalisiert und GelMA *High* verfügte über 78 % funktionalisierte NH₂-Gruppen. Die bei der Vernetzung ablaufende Reaktion verläuft nach dem radikalischen Kettenmechanismus. Während dieser Reaktion werden große Mengen freier

Radikale erzeugt, die zytotoxische Eigenschaften besitzen können.^{89,243} Um die Vernetzung durch einen radikalischen Kettenmechanismus zu umgehen, wurden Photopolymere synthetisiert, die sich durch die Thiol-En Reaktion vernetzen lassen. Die Thiol-En Reaktion verläuft nach einem radikalischen Stufenmechanismus, wodurch während der Reaktion weniger freie Radikale vorhanden sind.¹⁶³ Zusätzlich ist die Reaktion unempfindlich gegenüber dem Einfluss von Sauerstoff. Die orthogonale Reaktion zwischen Norbornen und Thiolen führt außerdem zu einer homogeneren Netzwerkstruktur als der radikalische Kettenmechanismus.^{243,244} Für den Einsatz im *Tissue Engineering* hat sich die Reaktion zwischen Thiolen und Norbornenen als erfolgreich erwiesen. Durch die Funktionalisierung von Gelatine mit Norbornen wurde das Photopolymer GelNB erhalten. Die durchgeführte Synthese wurde bereits 2018 von van Hoorick *et al.* beschrieben.²¹⁸ Durch den Einsatz der aus der Peptidchemie bekannten EDC/NHS-Chemie konnte Gelatine an den Lysinseitenketten durch Norbornencarbonsäure zu GelNB funktionalisiert werden. Die Verwendung von EDC als Hydrochlorid ermöglichte die Durchführung der Synthese in wässriger Umgebung. Durch das Variieren der verwendeten Menge an Norbornencarbonsäure konnten Photopolymere mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden erhalten werden. GelNB *Low* wies einen Funktionalisierungsgrad von 20 % auf, GelNB *Medium* 53 % und GelNB *High* 97 %. Die gewählte Synthesestrategie erwies sich aus mehreren Gründen als effektiv. Durch die Variation der Norbornencarbonsäure-Menge wurde ein breites Spektrum von Funktionalisierungsgraden erhalten.¹⁵⁴ Die Durchführung der Reaktion in wässriger Umgebung machte außerdem aufwendige Reinigungsschritte des Produktes überflüssig, sodass die Reinigung des Produktes durch Dialyse ausreichend war. Für die Vernetzung von GelNB wurden in dieser Arbeit das von van Vlierberghe *et al.* beschriebene Photopolymer GelS eingesetzt.¹⁶⁶ Durch die Funktionalisierung von Gelatine durch ein Thiolacton zum Photopolymer GelS konnten zwei verschieden stark funktionalisierte Photopolymere erhalten werden. GelS *Low* wies eine Funktionalisierung von 20 % auf, GelS *Medium* von 50 %. Eine Erhöhung der Funktionalisierung war auch durch eine Steigerung der Menge des eingesetzten Thiolierungsreagenzes nicht möglich.¹⁵⁴ Die Vernetzung von GelNB mit GelS zum Hydrogel GelNB/GelS benötigte gegenüber GelMA weniger Photoinitiator und eine deutlich reduzierte Polymerisationszeit.¹⁵⁴ Dadurch konnte GelNB/GelS unter mildereren Bedingungen als GelMA vernetzt werden, was es zu einem vielversprechenden Material für den Einsatz im *Tissue Engineering* macht.^{130,154,157} Neben den oben beschriebenen Eigenschaften eines Materials ist auch dessen Möglichkeit zur Sterilisation und eine hohe *Batch-to-Batch* Konsistenz von großer Bedeutung.^{23,180} Insbesondere für den Transfer aus der Forschung in die medizinische Anwendung kommen diese Aspekte zum Tragen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit auch untersucht, ob sich die Photopolymere sterilisieren lassen. Da Gelatine-haltige Lösungen nur bei Temperaturen von etwa 40 °C vollständig flüssig sind, lassen sie sich nur schlecht steril

filtrieren, wodurch andere Möglichkeiten zur Sterilisation genutzt werden müssen. Im Rahmen dieses Projektes wurde untersucht, wie sich das Autoklavieren auf die einzelnen Photopolymere auswirkt. Es zeigte sich, dass das Autoklavieren zwar zu Sterilität führte, gleichzeitig aber zu veränderten Eigenschaften der Hydrogele. So ließen sich die Photopolymere mit den niedrigsten Funktionalisierungsgraden nicht mehr vernetzen und die viskoelastischen Eigenschaften aller Hydrogele wurden stark verändert. Da Gelatine ein Hydrolyseprodukt des Proteins Kollagen ist, ist auch die Gelatine empfindlich gegenüber hohen Temperaturen.¹⁸⁹ Die hohen Temperaturen zerstören die Primärstruktur der Gelatine, was zu einer verkürzten Kettenlänge und dadurch zu einer Abnahme der Stabilität der Hydrogele führt. Dieser Effekt zeigte sich sowohl für GelMA, als auch für die GelNB/GelS Hydrogele. O'Connell *et al.* evaluierten in einer Arbeit verschiedene Methoden zur Sterilisation von Komponenten von Biotinten.¹⁸⁹ Aus ihrer Sicht eignet sich die Begasung der Feststoffe am besten zur Sterilisation der Komponenten von Biotinten, da diese die Eigenschaften nicht verändert.¹⁸⁹ Die Sterilisation durch Begasen mit EtO gehört bereits zu den zugelassenen Verfahren für die Sterilisation von Geräten und Vorrichtungen in der Medizin.^{23,245} Neben der Sterilität spielt auch die Konsistenz und damit die Reproduzierbarkeit eines Materials eine große Rolle. Besonders die Zusammensetzung von Materialien natürlicher Herkunft ist oft nicht ausreichend charakterisiert und unterscheidet sich stark zwischen Produkten einzelner Herstellungsprozesse.⁶ Eine finale Lösung für dieses Problem konnte bis jetzt nicht gefunden werden, wodurch der Transfer der artifiziellen Gewebe in die Anwendung deutlich erschwert sein dürfte.

Um die Einsatzmöglichkeiten der Hydrogele zu erweitern, wurden Vernetzer eingesetzt, die sich durch eine einfache Synthese herstellen und verändern lassen. So könnten zukünftig zum Beispiel zusätzliche reaktive Gruppen oder bioaktive Moleküle in Hydrogele eingebaut werden. Da die lichtinduzierte Vernetzung von GelS einen Reaktionspartner erfordert, der entweder über eine Doppel- oder Dreifachbindung verfügt, wurden neben GelNB auch PEGDA und verschiedene Peptoide zur Vernetzung eingesetzt. Die Peptoide wurden mit der Submonomermethode synthetisiert und in deren Länge und Seitenketten variiert. Als Reaktionspartner für GelS wurde in den Peptoiden an der ersten und letzten Position eine Dreifachbindung eingebaut. Die Vernetzungsreaktion folgt ebenfalls einem radikalischen Stufenmechanismus und ließ sich ebenfalls unter milden Bedingungen durchführen.²³³ Gegenüber GelNB/GelS zeigte sich jedoch, dass größere Mengen Photoinitiator benötigt wurden um die Reaktion zu initiieren und eine zuverlässige Vernetzung zu erreichen. Zusätzlich zeigte sich, dass eine Ausrichtung von eingebetteten Fibroblasten nur bei der Kultivierung in einer Multiwell-Platte mit großer Mediumzufuhr erreicht werden konnte. Insgesamt zeigten sich die mit Peptoiden vernetzten Gele biokompatibler und besser einsetzbar als solche mit PEGDA als Vernetzer, gegenüber GelMA und GelNB/GelS zeigten

sich jedoch große Nachteile hinsichtlich der Zuverlässigkeit und der Biokompatibilität. Die einfache Herstellung und Handhabung, sowie die hohe Biokompatibilität machen die Hydrogele GelMA und GelNB/GelS zu den geeigneteren Kandidaten für die Anwendung im *Tissue Engineering*. Aufbauend auf der Arbeit von Sonja Haase wurden die hergestellten Hydrogele GelMA und GelNB/GelS weiter charakterisiert und angewendet. Die toxikologische Analyse der nicht-zellulären und zellulären Abbauprodukte zeigte eine geringe Toxizität für alle untersuchten Hydrogele. Für GelNB/GelS Hydrogele konnte außerdem gezeigt werden, dass sie sich für die Einbettung von Fibroblasten in unterschiedlichen Zellkonzentrationen eignen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Materialien flexibel in ihrer Anwendung sind und sich als vielversprechende Kandidaten für den Aufbau verschiedenster artifizierender Gewebe eignen. Da der Aufbau von artifizierender Geweben im Hinblick auf den Einsatz in der regenerativen Medizin und für Wirkstoffstudien präzise, reproduzierbar und kontrollierbar sein muss, hat der Einsatz von 3D Biodruckern in den letzten Jahren stark zugenommen.³³ Die Entwicklung verschiedener 3D Biodrucktechnologien ermöglicht es, Zellen und Materialien computergestützt präzise in definierte Strukturen zu positionieren. Die dabei eingesetzte Biotinte besteht aus dem Material, welches die ECM nachbilden soll, gemischt mit den gewebespezifischen Zellen. Die am häufigsten genutzte 3D Biodrucktechnologie im *Tissue Engineering* ist der extrusionsbasierte 3D Biodruck. Ähnlich einem FDM-Drucker wird die Biotinte durch pneumatische oder mechanische Krafteinwirkung durch eine Nadel dispensiert und durch eine automatische Bewegung des Druckkopfes in eine vorgegebene Struktur gebracht.²³ Für den extrusionsbasierten Druckvorgang werden Materialien mit hoher Viskosität, welche scherverdünnen sind, benötigt.⁶ Gelatine-basierte Hydrogele eignen sich hierfür besonders gut, da sie thermosensitiv sind. Die Viskosität kann durch Anpassen der Temperatur während des Druckvorganges beeinflusst werden und so die nötige Formstabilität bis zur lichtinduzierten Vernetzung erreicht werden. Für die Hydrogele GelMA und GelNB/GelS wurde in dieser Arbeit die optimale Temperatur für den Druckvorgang bestimmt. Der verwendete 3D Biodrucker verfügte über einen Spritzenpumpen-basierten Extrusionsdruckkopf, wodurch die Dispension durch eine mechanische Kraft ausgelöst wurde. Hierdurch lässt sich die Extrusion präzise steuern. Die Auflösung der gedruckten Struktur ist unter anderem vom Durchmesser des abgelegten Filamentes abhängig. Wird die Extrusion durch eine mechanische Kraft ausgelöst, lässt sich der Durchmesser des Filamentes präzise einstellen. Dies ist neben der Auflösung der Struktur auch für die Wahl der Dosiernadel entscheidend. Da der Filamentdurchmesser bei der mechanischen Extrusion maßgeblich von der Extrusionsgeschwindigkeit und nicht ausschließlich vom Nadelndurchmesser bestimmt wird, konnte für alle Druckvorgänge eine konische Dosiernadel mit dem Durchmesser von 250 µm verwendet werden. Für diese Dosiernadel konnte in Zusammenarbeit mit Bruna Regina Maciel und Sonja Haase gezeigt werden, dass der Scherstress, der auf die Zellen

während des Druckes wirkt, gegenüber Standardnadeln deutlich reduziert ist.¹³⁰ Zusätzlich ist bekannt, dass sich der vorhandene kritische Scherstress in konischen Dosiernadeln auf die Nadelspitze bezieht und die Zellen in der Biotinte diesem nur für eine sehr kurze Zeit ausgesetzt sind. Durch die Verwendung von konischen Dosiernadeln und Hydrogelen als Biotinten kann die Viabilität von extrudierten Zellen erhöht werden.^{23,246} Um die Biokompatibilität des Druckvorganges am BioSpot BP (Biofluidix GmbH) zu überprüfen, wurden die verschiedenen Photopolymere mit Zellen gemischt und zu Gitterstrukturen verdrückt. Durch Drucken bei der ermittelten Drucktemperatur konnte eine hohe Formstabilität bis zur lichtinduzierten Vernetzung sichergestellt werden. Die mikroskopische Auswertung zeigte, dass sich der Druckvorgang nicht negativ auf die Viabilität der Fibroblasten auswirkte. Sowohl GelMA als auch GelNB/GelS zeigten sich als geeignete Biotinte für den extrusionsbasierten 3D Biodruck.

Da artifizielle Gewebe aus unterschiedlichen Gründen über eine Simulation der Durchblutung verfügen sollten, wurde zunächst ein Modell der Blut-Hirn-Schranke durch Bedrucken eines etablierten *Organ-on-a-chip* Systems aus Polycarbonat (PC) mit den Biotinten GelMA8.0 und GelNB/GelS *Medium* aufgebaut. Die Simulation des Blutflusses setzt die Zellen im Modell mechanischen Reizen aus, die zu ihrer natürlichen Funktion beitragen.¹³² Weiter wird die Versorgung der Modelle durch die Durchblutung sicherstellt. Das verwendete *Organ-on-a-chip* System verfügte über einen Mikrokanal, der das Blutgefäß simulierte. Die Außenseite des Mikrokanals wurde mit Biotinten bedruckt, sodass diese eine *in vivo* ähnliche Anordnung der Zellen ermöglichten. Hierzu wurde zunächst die Positionierung der Zellen überprüft. Die erste Schicht wurde aus einer Biotinte mit Perizyten gedruckt und ausgehärtet. Die zweite Schicht bestand aus der Biotinte mit Astrozyten und Fibroblasten. Bei der mikroskopischen Auswertung zeigte sich, dass die Schichten klar voneinander getrennt vorlagen und keine Vermischung stattfand. Dies zeigte deutlich, dass sich in der direkten Umgebung des simulierten Blutgefäßes nur Perizyten befanden und sich die Astrozyten und Fibroblasten nur in der zweiten Schicht befanden. Für den Aufbau des eigentlichen Modells wurden die einzelnen Schichten nach dem gleichen Druckprotokoll gedruckt. Die den Mikrokanal umgebende Schicht enthielt Perizyten, die zweite Schicht enthielt Astrozyten und Neuronen. Um den Zellen eine Anpassung an die neue Umgebung zu ermöglichen, wurde der Druckvorgang über mehrere Tage durchgeführt. Die Auskleidung des Mikrokanals erfolgte mit cerebralen Endothelzellen, sodass abschließend ein Modell der BBB mit Endothelzellen, Perizyten, Astrozyten und Neuronen vorlag, welches unter fluidischen Bedingungen an einer Spritzenpumpe kultiviert wurde. Die mikroskopische Beobachtung der Modelle zeigte, dass sich solche aus GelNB/GelS besser eigneten. Der Anteil lebender Zellen war in dem GelNB/GelS Hydrogel deutlich höher als in dem Modell aus GelMA, zusätzlich zeigte sich eine erhöhte Stabilität des Modells aus GelNB/GelS mit zunehmender Kultivierungsdauer. Der Aufbau

bereits etablierter Modelle auf einem PC-Substrat stellt eine vielversprechende Möglichkeit dar, zukünftig Gewebemodelle zu generieren, die für den Einsatz im Wirkstoffscreening und als Ersatz für Tierversuche in toxikologischen Studien geeignet sind. Die Kombination von Chip-Systemen mit dem 3D Biodruck ermöglicht eine teil-automatisierte Generierung und einen einfachen Anschluss an mikrofluidische Pumpensysteme. Durch den Einsatz von 3D Biodruckern kann außerdem die Einheitlichkeit der Modelle erhöht werden.²⁴⁷ Zusätzlich ist der Aufbau der Gewebe dann unabhängiger von menschlichen Fehlern. Bedruckte *Organ-on-a-chip* Systeme eignen sich jedoch nicht für den Einsatz in der regenerativen Medizin, da die verwendeten festen Materialien wie PC nur bedingt für eine Implantation geeignet sind. Da die Vaskularisierung von Geweben jedoch auch für Implantate eine große Rolle spielt, wurden bereits unterschiedliche Ansätze für die Vaskularisierung von artifiziellen Geweben untersucht. Zum einen wurde versucht, Zellen durch Wachstumsfaktoren und andere Signalmoleküle so zu beeinflussen, dass sie vaskuläre Strukturen ausbilden.¹⁹⁴ Dies erfordert jedoch ein Material, welches an den bestimmten Stellen diese Signale in Form von zum Beispiel mechanischen Reizen oder bioaktiven Molekülen besitzt. Zum anderen wurde versucht tubuläre Strukturen mit verschiedenen Methoden zu drucken.^{25,248} Eine dieser Methoden ist der Einsatz von Opfermaterialien. Aus den Opfermaterialien wird eine Struktur gedruckt, die später aus der fertigen Struktur wieder entfernt wird.²⁴⁹ Da es sich bei Hydrogelen um weiche Materialien handelt, wird eine temporäre Stabilisierung der Hohlstruktur durch ein Opfermaterial benötigt. Die Opferstruktur sorgt für die nötige Stabilität der Struktur bis zur lichtinduzierten Vernetzung. Das Opfermaterial muss sich unter Bedingungen aus der Struktur herauslösen lassen, welche die umgebende Struktur nicht beschädigen. Dies kann zum Beispiel durch Einsatz eines thermosensitiven Materials wie Pluronic oder Gelatine realisiert werden. Pluronic und Gelatine wurden bereits erfolgreich als Opfermaterialien eingesetzt, wobei sich bei Pluronic der Nachteil zeigte, dass es über lange Zeiten toxisch auf Zellen wirkt.^{216,250} Dies kann sich als Problem darstellen, wenn das Opfermaterial nicht vollständig entfernt wurde. Für den Druckvorgang von Hohlstrukturen wurde in dieser Arbeit Gelatine als Opfermaterial verwendet. Gelatine ist biokompatibel, vollständig bioabbaubar und verflüssigt sich bei physiologischen Temperaturen. Dadurch eignete sie sich gut als Opfermaterial für den 3D Biodruck. Die in dieser Arbeit generierten Hohlstrukturen bestanden zunächst nur aus dem jeweiligen Hydrogel (GelMA *High* oder GelNB/GelS *High*) und Gelatine. Später wurde das MX-System entwickelt, welches es ermöglichte, dass die gedruckten Strukturen Dosiernadeln enthielten, worüber sie an eine Pumpe angeschlossen werden konnten. Das MX-System wurde in Zusammenarbeit mit Michael Grün (Fakultät für Maschinenbau und Mechatronik, Hochschule Karlsruhe) konstruiert und hergestellt. Es besteht aus einem Rahmen aus Polycarbonat, welcher zylindrische Dosiernadeln enthält und oben und unten durch ein Deckglas verschlossen werden kann. Dabei dient das untere Deckglas gleichzeitig als Substrat, welches bedruckt

wird. Die beiden Deckgläser ermöglichen außerdem die Mikroskopie der gedruckten Strukturen. Durch eine Optimierung des Druckprozesses gelang es, stabile Strukturen aus Hydrogelen herzustellen, die perfundierbar waren. Der Vorteil von Gelatine als Opfermaterial liegt darin, dass die Zellen, welche später den Hohlraum auskleiden sollen, direkt darin vorliegen können und bereits mit dem Druck der Opferstruktur in die finale Struktur eingebracht werden. Durch Inkubation der gedruckten Strukturen bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit bei konstanter Drehung um die Längsachse der Opferstruktur können die enthaltenen Zellen an die Wand der Opferstruktur gebracht werden und dort adhären. So lässt sich die Besiedelung der Hohlraumstruktur vornehmen, ohne dass die Opferstruktur dazu entfernt werden muss. Dies verringert beim Einsatz von Hydrogelen oder anderen weichen Materialien das Risiko einer Beschädigung beim Entfernen der Opferstruktur und der anschließenden Besiedelung mit Zellen. Der Einsatz von Opferstrukturen ermöglicht den 3D Biodruck von vaskulären Strukturen aus weichen Materialien. In Kombination mit Vorrichtungen wie dem MX-System können diese Strukturen flexibel gestaltet und perfundiert werden. Zur Kultivierung der gedruckten Strukturen eignen sich die Vorrichtungen ebenfalls, da sie eine fluidische Versorgung ermöglichen. Sollen die gedruckten Konstrukte als Implantate fungieren, müssen diese nach abgeschlossener Vorbereitung *in vitro* vom System getrennt werden. Bis solche gedruckten Strukturen jedoch in der Pharmaindustrie und der regenerativen Medizin zum Einsatz kommen können, sind neben den bekannten Herausforderungen auch die rechtlichen Hürden noch zu bewältigen.²⁵¹ Bis jetzt gibt es keine genauen regulatorischen Vorgaben, Biodrucker sind von den internationalen Zulassungs- und Überwachungsbehörden wie der *U.S. Food&Drug Administration* (FDA) oder der *European Medicines Agency* (EMA) noch nicht klassifiziert. Ebenso ist nicht geklärt, als was 3D gedruckte Konstrukte eingeordnet werden.^{23,252,253} Somit ist eine genaue Charakterisierung eines Materials zwar möglich, jedoch mit großen Unsicherheiten verbunden, da es keinen Standard gibt, der zum Beispiel die Biokompatibilität vergleichbar macht.

Neben dem extrusionsbasierten 3D Biodruck wurde das Hydrogel GeINB/GeIS *High* auch im DLW als Biolack eingesetzt. DLW beruht auf der Zwei-Photonen-Absorption (2PA) und ermöglicht dadurch das Erstellen von sehr kleinen Strukturen mit Auflösungen im Submikrometerbereich. Aus kommerziell erhältlichen Photolacken wurden in der Vergangenheit vor allem Stützstrukturen erzeugt, die später mit Zellen besiedelt wurden. Durch den Einsatz von Beschichtungen und Multimaterialdruck konnte Zellen so direkt beeinflusst und positioniert werden. Lange Zeit galt DLW als ungeeignet für den 3D Biodruck, da die kleinen Strukturen nur schwer in biologisch relevante Strukturen transferiert werden konnten. Die Weiterentwicklung der Technologie ermöglichte jedoch bald durch beschleunigte Schreibgeschwindigkeiten eine Verkürzung der Schreibvorgänge für Strukturen von biologisch relevanter Größe.^{46,254} Dobos *et al.* machten als größte Herausforderung das Fehlen von

sogenannten Biolacken aus. Biolacke, welche sich in Anwesenheit von Zellen, in *high speed* Prozessen mit DLW verschreiben lassen, sind kaum bekannt.⁴⁶ Die Thiol-En Reaktion ist jedoch reaktiv genug, um im DLW eingesetzt werden zu können. 5 % GelNB/GelS *High* wurde deshalb auf seine Eignung als Biolack für das DLW untersucht. Hierbei wurde zunächst die mindestens nötige Menge LAP bestimmt und anschließend 3D Gitterstrukturen aus dem Biolack geschrieben. Die Viabilität der eingekapselten Zellen erwies sich als deutlich eingeschränkt. Weder in der Kontrolle noch in den geschriebenen Strukturen konnten viable Zellen detektiert werden. Da für einen erfolgreichen Schreibvorgang 1 % LAP im Biolack benötigt wurde, war ein erhöhter toxischer Effekt zu erwarten. Dobos *et al.* konnten zeigen, dass sich Zellen durch DLW erfolgreich in Strukturen einkapseln lassen, sie verwendeten jedoch einen anderen Photoinitiator und eine höhere Photopolymerkonzentration (7,5 %).⁴⁶ Dieses Vorgehen zeigt, dass DLW eine Technologie darstellt, die sich in Kombination mit dem richtigen Material und Photoinitiator für den 3D Biodruck eignet. Durch weitere Optimierung der technischen Gegebenheiten des Schreibens kann außerdem erreicht werden, dass zukünftig auch größere Strukturen mit hoher Auflösung geschrieben werden können. Besonders die Kombination von herkömmlichen 3D Biodrucktechnologien wie dem extrusionsbasierten 3D Biodruck mit unkonventionellen Technologien wie dem DLW ermöglichen den Aufbau von präzisen Strukturen außergewöhnlicher Geometrien und Größen. DLW stellt die Chance dar, sehr feine biologische Strukturen nachzubilden, die mit den herkömmlichen Verfahren nicht erzeugt werden können. Zusätzlich gibt es im DLW aus technologischer Sicht nur wenig Einschränkungen im Hinblick auf die erzeugbaren Geometrien. Es zeigte sich auch hier, dass das Existieren eines geeigneten Materials der limitierende Faktor ist. Neben den Herausforderungen, vor denen Forscher im Hinblick auf ein geeignetes Material, geeignete Fabrikationsmethoden und regulatorische Anforderungen stehen, bildet die Seite der Analyse der erzeugten Gewebe eine weitere große Aufgabe. Unabhängig davon wie die artifiziellen Gewebe erzeugt wurden und für was sie eingesetzt werden sollen, müssen sie auf verschiedenste Dinge untersucht werden. Zum Beispiel muss die korrekte Anordnung der Zellen im Gewebe, die einwandfreie Funktion, mechanische Eigenschaften und die Bioverträglichkeit für jede erzeugte Struktur nachgewiesen sein. Besonders Gewebe, welche in der regenerativen Medizin zum Einsatz kommen sollen, müssen zusätzlich auf ihre Keimfreiheit überprüft sein. Die hierzu zur Verfügung stehenden Methoden beruhen auf Verfahren, die das untersuchte Konstrukt berühren oder zerstören.^{237,238,255,256} Die im erzeugten Gewebe enthaltenen Zellen müssen vor dem Mikroskopieren gefärbt werden. Um bestimmte Zelltypen nachzuweisen, erfordert dies oft eine Fixierung und Antikörperfärbung, wodurch das untersuchte Gewebe unbrauchbar wird. Auch die Überprüfung der Funktion erfordert Methoden, bei denen das Gewebe mit Stoffen in Kontakt kommt, die nicht darin verbleiben dürfen. Die Messung der mechanischen

Eigenschaften erfolgt mit einem Rheometer, welches die aufgelegte Probe zerstört. Kontaktlose Messungen von rheologischen Eigenschaften sind mittlerweile jedoch möglich, auch wenn diese noch nicht den vollen Funktionsumfang eines herkömmlichen Rheometers bieten.¹²⁹ Eine Möglichkeit, diese Probleme zu umgehen, wäre zum Beispiel, die Generierung von jeweils mehreren identischen Geweben, wovon einige ausschließlich zu analytischen Zwecken genutzt werden. Dies erfordert jedoch abermals ein Material, welches über konsistente Eigenschaften verfügt und standardisiert hergestellt wird. Zusätzlich wird eine Herstellungsmethode benötigt, die unabhängig von äußeren Einflüssen zuverlässig die Gewebe generiert. Eine große Chance hierfür bietet jedoch der 3D Biodruck, wodurch zukünftig Gewebe vollautomatisch generiert werden könnten.^{247,257,258} Die Entwicklung von kontaktlosen Analyseverfahren könnte all diese Aufgaben lösen.^{129,259} Bis implantierbare Organe aus dem 3D Biodrucker kommen, werden noch Jahrzehnte vergehen. Weltweit sind noch große Anstrengungen auf verschiedenen Ebenen nötig, um diese Vision Wirklichkeit werden zu lassen. Dennoch bietet das *Tissue Engineering* eine realistische Möglichkeit, zukünftig defekte oder krankhafte Gewebe durch artifiziellen Ersatz auszutauschen, zusätzlich eröffnen sich durch Gewebemodelle neue Möglichkeiten für die Untersuchung von Krankheiten und potentiellen Wirkstoffen. Der 3D Biodruck ermöglicht im *Tissue Engineering* eine hohe Reproduzierbarkeit. Die Kombination verschiedener Materialien und Methoden könnte der Schlüssel zum Erfolg sein. Der Schlüssel dafür, dass aus einer Vision Realität wird.

6 Material und Methoden

6.1 Verwendete Zelllinien/Primärzellen

HA (humane Astrozyten, SC-1800, Provitro GmbH)

HBVP (humane Hirngefäßperizyten, Provitro GmbH)

hCMEC/D3 (humane cerebrale Endothelzellen, SCC066, Merck KgA)

HepG2 – humane Leberkrebszelllinie

HN (humane Neuronen, 1520-5, Provitro GmbH)

HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, C12980, PromoCell GmbH)

NHDF (Normal Human Dermal Fibroblasts, CC-2511, Lonza Ltd)

6.2 Material und Reagenzien - Zellkultur

| | Nummer | Hersteller/Lieferant |
|--|----------|---|
| Medien/Puffer/Zusätze | | |
| DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium, High Glucose | 41966052 | Gibco ® LifeTechnologies (Carlsbad, USA) |
| DMSO, Dimethylsulfoxid, BioScience Grade | A994 | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |
| DPBS ⁻ , Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, ohne Kalzium und Magnesium | 14190250 | Gibco ® LifeTechnologies (Carlsbad, USA) |
| EGM-2, Endothelial Cell Growth Medium-2 | C-22011 | PromoCell GmbH (Heidelberg, Deutschland) |
| FGM-2, Fibroblast Groth Medium-2 | CC-3132 | Lonza Sales Ltd (Basel, Schweiz) |
| Fötales Kälberserum, qualifiziert, Südamerika, LOT 2096995 | 10270106 | Gibco ® LifeTechnologies (Carlsbad, USA) |
| Penicillin-Streptomycin-Lösung | 15140130 | Gibco ® LifeTechnologies (Carlsbad, USA) |
| TritonX-100 für Molekularbiologie | T8787 | Sigma Aldrich Chemie (Taufkirchen, Deutschland) |
| Trypsin-EDTA (0.25%) | 25200056 | Gibco ® LifeTechnologies (Carlsbad, USA) |
| Farbstoffe | | |
| Höchst 33342, Trihydrat, 10 mg/mL in Wasser | H3570 | Invitrogen (Carlsbad, USA) |
| Calcein-AM | C3099 | Life Technologies (Carlsbad, USA) |
| CellTiter 96(R) Non-Rad Cell Prolif Assay | G4100 | Promega GmbH (Mannheim, Deutschland) |

| | | |
|---|------------|--|
| CellTracker™ green CMFDA Dye | C7025 | Invitrogen (Carlsbad, USA) |
| PrestoBlue™ Cell Viability Reagent | A12362 | Molecular Probes®, Life Technologies GmbH (Carlsbad, USA) |
| Propidiumiodid | 25535-16-4 | Sigma Aldrich Chemie (Taufkirchen, Deutschland) |
| Verbrauchsmaterialien | | |
| μ-slide 8 well | 80826 | ibidi GmbH (Martinsried, Deutschland) |
| Kryoröhrchen, 2 mL | 479-1262 | VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland) |
| Manuelle Pipettenspitzen, 0,1-10 μL | 613-2140 | VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland) |
| Manuelle Pipettenspitzen, 100- 1250 μL | 613-0738 | VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland) |
| Manuelle Pipettenspitzen, 1-200 μL | 613-0732 | VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland) |
| Messpipetten, AR-Glas, 5/10/20 ml | | Brand GmbH (Wertheim, Deutschland) |
| Pasteurpipetten, Natron- Kalk-Glas | 612-1702 | VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland) |
| Petrischale, PS | 391-0598 | VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland) |
| Reaktionsgefäß, Safe- Lock, 1,5 mL | 30120086 | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) |
| Reaktionsgefäß, Safe- Lock, 1,5 mL, amber | 30120191 | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) |
| Reaktionsgefäß, Safe- Lock, 2 mL | 30120094 | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) |
| Sterilfilter, Rotilabo®, Porengröße 0,22 μm | P668 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Zellkulturflasche CellStar, Filterschraubverschluss, 175 cm² | 660175 | Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland) |
| Zellkulturflasche CellStar, | 658175 | Greiner Bio-One GmbH |

| | | |
|--|------------------|--|
| Filterschraubverschluss, 75 cm ² | | (Frickenhausen, Deutschland) |
| Zellkulturplatte, Cellstar, 12, 96 Wells, Flachboden | 665180 665160 | Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland) |
| Zellkulturschale, Cellstar, 35 mm | | Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland) |
| Zentrifugenröhrchen, konischer Boden, 15 mL | 188261 | Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland) |
| Zentrifugenröhrchen, konischer Boden, 50 mL | 210261 | Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland) |

6.3 Zusammengesetzte Medien und Puffer

| Zellkultur | | Zusammensetzung |
|-------------------------------------|-----|--|
| Astrozytenmedium | | <ul style="list-style-type: none"> • AM 500 mL (Provitro/Sciencell) • AGS-Zusätze • 1 % P/S |
| Einfriermedium HepG2 und NHDF | für | <ul style="list-style-type: none"> • 50 % FCS • 40 % DMEM • 10 % DMSO |
| Einfriermedium HUVEC | für | <ul style="list-style-type: none"> • 50 % FCS • 40 % EGM-2 • 10 % DMSO |
| Einfriermedium für NHLF | | <ul style="list-style-type: none"> • 50 % FCS • 40 % FGM-2 • 10 % DMSO |
| Kultivierungsmedium für hCMEC/D3 | für | <ul style="list-style-type: none"> • EBM-2 (PromoCell GmbH) • 1 % P/S • 2,5 % FCS • 0,55 µM Hydrocortison • 0,025 % Ascorbinsäure • 0,025 % bFGF • 0,025 % EGF • 0,025 % IFG-1 • 0,025 % VEGF |
| Perizytenmedium | | <ul style="list-style-type: none"> • PM 500 mL (Provitro/Sciencell) • PGS-Zusätze • 1 % P/S |
| Trypsininhibitor | | <ul style="list-style-type: none"> • 90 % DPBS⁻ • 10 % FCS |

Synthese/Analyse

| | |
|---|---|
| Natriumcarbonatpuffer für TNBSA-Assay | <ul style="list-style-type: none"> • 95 % 0,1 M NaHCO₃ • 5 % 0,1 M Na₂CO₃ |
| Natriumcarbonatpuffer für GeIS-Synthese | <ul style="list-style-type: none"> • 60 % 0,1 M Na₂CO₃ • 40 % 0,1 M NaHCO₃ |
| LB-Agar | <ul style="list-style-type: none"> • 5 g/L Hefeextrakt • 10 g/L Trypton • 10 g/L NaCl • 15 g/L Agar |

6.4 Chemikalien und Reagenzien**Chemikalien**

| | | |
|--|-------------------|---|
| 1,3-Di-Boc-2-(trifluormethylsulfonyl)guanidin | 10614945 | ThermoFisher Scientific GmbH (Waltham, USA) |
| 1,4-Diaminobutan | D0289 | TCI Chemicals Deutschland (Eschborn, Deutschland) |
| ACN, Acetonitril ROTISOLV | HN44 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| a-Cyano-4-hydroxymethylsäure | 476870 | Sigma Aldrich Chemie (Taufkirchen, Deutschland) |
| Ammoniaklösung 25 % | 06010.3010 | Bernd Kraft GmbH (Duisburg, Deutschland) |
| Boc ₂ O, Di- <i>tert</i> -butyldiäcarbonat | D1547 | TCI Chemicals Deutschland (Eschborn, Deutschland) |
| Bromessigsäure | B56307 | Sigma Aldrich Chemie (Taufkirchen, Deutschland) |
| DCM, Dichlormethan | UN1593 | ThermoFisher Scientific GmbH (Waltham, USA) |
| DIC, Diisopropylcarbodiimid | <i>N,N</i> -D0254 | TCI Chemicals Deutschland (Eschborn, Deutschland) |
| DMF, Dimethylformamid | CP79 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| DTT, Dithiothreitol | 6908 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| EDC-HCl, (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid) | 2156 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| EDTA, Ethylendiamintetraacetat | 8043 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |

| | | |
|--|------------|---|
| Ethanol absolut | 20.821.296 | VWR Chemicals (Bruchsal, Detuschland) |
| Ethylendiamin | A0887 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Gelatine Typ A, Bloom 300 | G2500 | Sigma Aldrich Chemie (Taufkirchen, Deutschland) |
| HCl, Salzsäure | H1758 | Sigma Aldrich Chemie (Taufkirchen, Deutschland) |
| Hefeextrakt | 2363 | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| HOBt, 1-Hydroxybenzotriazol | 54802 | Sigma Aldrich Chemie (Taufkirchen, Deutschland) |
| Kühlfüssigkeit für Fryka Umlaufkühler, HKF15.1 MW65 | 3352/5 | Conzelmann Schweißhandelsgesellschaft mbH (Burgau, Deutschland) |
| LAP, Lithium-Phenyl-(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinat | L0290 | TCI Chemicals (Eschborn, Deutschland) |
| MAA, Methacrylsäureanhydrid | 276685 | Sigma Aldrich Chemie (Taufkirchen, Deutschland) |

6.5 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial

| | | |
|--|--------------|---|
| Dialyseschlauch 12-14 kD, Breite 43 mm | D9527 | Sigma Aldrich Chemie (Taufkirchen, Deutschland) |
| Adhäsionsobjektträger Q-Path (R) Plus 76x26 mm | LBQP10048101 | VWR Part of Avantor (Bruchsal, Deutschland) |
| Deckel für Kurzgewindeflasche ND9, PP | 548-0784 | VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland) |
| Deckgläser 24x50 mm #1,0 | 613-0146 | VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland) |
| Deckgläser 24x50 mm #1,5 | 631-0147 | |
| Dosierernadel, standard, blau, 1/2", ID 410 µm | 505294 | Vieweg GmbH (Kranzberg, Deutschland) |
| Dosierernadel, konisch, blau, ID 410 µm | 500896 | Vieweg GmbH (Kranzberg, Deutschland) |
| Dosierernadel, konisch, grün, ID 840 µm | 500883 | Vieweg GmbH (Kranzberg, Deutschland) |
| Dosierernadel, konisch, lavendel, ID 150 µm | 500908 | Vieweg GmbH (Kranzberg, Deutschland) |

| | | |
|---|-----------|---|
| Dosiernadel, konisch, rot, ID 250 µm | 501510 | Vieweg GmbH (Kranzberg, Deutschland) |
| Einwegküvetten UVette 220-1600 nm | 30106318 | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) |
| Kanülen Sterican, 20 G, 40 mm | 4657519 | B.Braun (Melsungen, Deutschland) |
| Kanülen Sterican, 21 G, 120 mm | 4665643 | B.Braun (Melsungen, Deutschland) |
| Kartusche Optimum 3cc, klar | 7012072 | Nordson EFD (Erkrath, Deutschland) |
| Kartuschenverschluss drehbar | 7012198 | Nordson EFD (Erkrath, Deutschland) |
| Kombistopfen LL weiß | 8501552 | Megro gmbH (Wesel, Deutschland) |
| Kurzgewindeflasche ND9, klar, 1,5 mL | 548-0029 | VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland) |
| Parafilm M, 4 in.*125 ft. Roll | H666 | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |
| Probengläschen mit Deckel, 4 mL | 215-3572 | VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland) |
| PP-Reaktor 10 mL mit PE-Fritte | V001PE087 | MultiSynThech GmbH (Witten, Deutschland) |
| Spritze, Omnifix-F, 1 mL | 9161406V | B.Braun (Melsungen, Deutschland) |
| Spritzen, Inkjet, 10 mL | 4606108V | B.Braun (Melsungen, Deutschland) |
| Spritzen, Inkjet, LuerLock, 2 mL | 4606701V | B.Braun (Melsungen, Deutschland) |
| Stopfen, weiß für Kartusche 3 cc | 7012166 | Nordson EFD (Erkrath, Deutschland) |
| Verschlusskappe, blau für 3cc Kartusche | 7012190 | Nordson EFD (Erkrath, Deutschland) |
| Filament Ultimaker PC | | Ultimaker BV (Utrecht, Niederlande) |
| VHB™ Transfer-Klebeband | 9473PC | 3M Deutschland GmbH (Neuss, Deutschland) |

6.6 Geräte und Software

Zellkultur

| | |
|---|---|
| Absaugsystem VACUSafe | Integra Biosciences GmbH (Biebertal, Deutschland) |
| CO ₂ Inkubator C170 | Binder GmbH (Tuttlingen, Deutschland) |
| Manuelle Pipette Eppendorf Research Plus 0,5-10 µL | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) |
| Manuelle Pipette Eppendorf Research Plus 100- 1000 µL | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) |
| Manuelle Pipette Eppendorf Research Plus 10-100 µL | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) |
| Manuelle Pipette Eppendorf Research Plus 20-200 µL | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) |
| Manuelle Pipette Eppendorf Research Plus 2-20 µL | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) |

| | |
|---|---|
| Manuelle Pipette Eppendorf Research Plus 8x 20-200 µL | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) |
| Sicherheitswerkbank EnvAir EcoSafe | Carlo Erba Reagents (Emmendingen, Deutschland) |
| Stickstofftank Biosafe MD Chronos 100 | Messer Industriegase (Bad Solden, Deutschland) |
| Spritzenpumpe, Fusion 200 classic | Chemyx Inc (Stafford, USA) |
| Vortex-Schüttler | VWR Part of Avantor (Bruchsal, Deutschland) |
| Mikroskope | |
| Inverses Lichtmikroskop Leica DMI1 LED | Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland) |
| Konfokalmikroskop Leica TCS SPE DMI4000 B | Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland) |
| Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5 | Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland) |
| Weitfeldmikroskop Leica DMIL LED | Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland) |
| Sonstige Geräte | |
| 3D Drucker Ultimaker Extended | Ultimaker BV (Utrecht, Niederlande) |
| Absorptionsspektrometer SmartSpec3000 | BioRad Laboratories GmbH (München, Deutschland) |
| Autoklav Systec HX-200 | SystecLab GmbH (Linden, Deutschland) |
| BioSpot BP | Biofluidix GmbH (Freiburg, Deutschland) |
| Christ Alpha 3-4 LSCbasic | Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode am Harz, Deutschland) |
| Feinwaage LAG214i | Molecular Devices LLC (San Jose, USA) |
| Kühlsystem für 3D Discovery, Umwälzkühler Huber Pilot One | Peter Huber Kältemaschinen AG (Offenburg, Deutschland) |
| Magnetrührer mit Heizplatte VMS C7 | VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland) |
| Massenspektrometer UltrafleXtreme mit Software FlexControl 3.4 und FlexAnalysis 3.4 | Bruker Daltonik GmbH (Billerica, USA) |
| Massenspektrometer 4800 Proteomics Analyser mit Software Explorer V4.9 (Build 115) | Applied Biosystems (Waltham, USA) |
| Photonic Professional GT2 | nanoscribe GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |
| Osram ultra VitaLux 300W | Osram GmbH (München, Deutschland) |
| pH/mV/°C-Messgerät pH110 | VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland) |

| | |
|--|--|
| pH-Messgerät pH20 | VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland) |
| Punktstrahler Omnicure S2000 | Excelitas Technologies (Waltham, USA) |
| PuriFlash 4125 | Interchim GmbH (Mannheim, Deutschland) |
| Radiometer R2000 | Excelitas Technologies (Waltham, USA) |
| regenHU 3D Discovery Gen1 | regenHU (Villaz-St Pierre, Schweiz) |
| Rheometer Physica MCR501 | Anton Paar Germany GmbH (Ostfildern-Scharnhausen, Deutschland) |
| Rheometer HAAKE Rheoscope 1 | Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, USA) |
| Schüttelbad | Grant Instruments (Cambridge, UK) |
| SpectraMax ID5 Mikroplattenleser | Molecular Devices LLC (San Jose, USA) |
| Spiegelreflexkamera Nikon D5100 mit Objektiv Nikkor 18- 105 mm | Nikon Europe BV (Amsterdam, Niederlande) |
| Taumelschüttler Unitwist 3D | Unieqio (Planegg, Deutschland) |
| Trockenschrank ED56 | Binder GmbH (Tuttlingen, Deutschland) |
| Kühlsystem für BioSpot BP, Umlaufkühler ULK 602 0 | Fryka-Kältetechnik GmbH (Esslingen, Deutschland) |
| Waage LPG-2102i | VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland) |
| Wärmeschrank UN55 | Memmert GmbH&Co KG (Schwabach, Deutschland) |
| Zentrifuge Megafuge 2.0R | Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland) |
| Zentrifuge Eppendorf Centrifuge 5810R | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) |
| Software | |
| ChemDraw20.0 | PerkinElmer (Waltham, USA) |
| Image Color Summarizer (webbased) | Martin Krzywinski (Vancouver, Kanada) |
| Microsoft Office 2019 | Microsoft Corporation (Albuquerque, USA) |
| Origin2020b | OriginLab Corporations (Northampton, USA) |
| LasX3.5.7 | Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland) |

6.7 Synthese

6.7.1 Photopolymere

6.7.1.1 GeIMA

Für die Synthese von GeIMA wurde 1 g Gelatine Typ A in 10 ml DPBS^{-/-} bei 50 °C unter Rühren gelöst. Mit einer Einwegspritze wurde die gewünschte Menge MAA (Tabelle 6) zugetropft und für 2 Min bei 50 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde nach Ablauf der 2 Stunden mit 10 ml erwärmtem DPBS^{-/-} verdünnt und weitere 10 min gerührt. Zur Reinigung des Produktes wurde die Reaktionslösung in Dialyseschläuche (Cellulose, Ausschlussgröße 12 14 kDa) überführt und für 7 Tage bei 40 °C gegen ddH₂O dialysiert. Ein Wasserwechsel erfolgte 2 Mal/Tag. Nach Abschluss der Dialyse wurde die Lösung in Falcons abgefüllt und bis zur Gefriertrocknung bei -80 °C gelagert. Nach der Gefriertrocknung (12 h, -108 °C) wurde das GeIMA als weißer Feststoff erhalten und bei -20 °C in Falcons gelagert.

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

Tabelle 6: Zur Synthese von GeIMA einzusetzendes MAA pro 1 g Gelatine. 1 Äquivalent entspricht 0,266 mmol NH₂-Gruppen pro 1 g Gelatine.

| Funktionalisierungsgrad | Äquivalente (MAA) | n (MAA) [mmol] | V (MAA) [μ l] |
|-------------------------|----------------------|-------------------|-----------------------|
| Low | 1 | 0,266 | 39,5 |
| Medium | 8 | 2,128 | 316 |
| High | 20 | 5,32 | 790 |

6.7.1.2 GeINB

Zur Synthese von GeINB wurde 5-Norbornene-2-carboxylsäure (NCS) in 10 ml MES-Puffer (0,5 M, pH 6) gegeben. Anschließend wurde 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDC-HCl) und danach N-Hydroxysuccinimid (NHS) zugegeben (NCS:EDC:NHS 1:2:1), die jeweiligen Mengen sind Tabelle 7 zu entnehmen. Die Reaktionslösung wurde auf 50 °C erwärmt und nach Erreichen der Temperatur für 15 Min gerührt. Nach Ablauf der Aktivierungszeit wurde 1 g Gelatine zugegeben und der pH-Wert mit NaOH auf 7,5-7,8 eingestellt. Die Lösung wurde über Nacht bei 50 °C gerührt. Zur Reinigung des Produktes wurde die Reaktionslösung nach Ablauf der Reaktionszeit in Dialyseschläuche (Cellulose, Ausschlussgröße 12 14 kDa) überführt und für 7 Tage bei 40 °C gegen ddH₂O dialysiert. Ein Wasserwechsel erfolgte 2 Mal/Tag. Nach Abschluss der Dialyse wurde die Lösung in Falcons überführt und bis zur Gefriertrocknung bei -80 °C gelagert. Nach der Gefriertrocknung (12 h, -108 °C) wurde GeINB als weißer Feststoff erhalten und bei -20 °C in Falcons 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 7: Zur Synthese von GelNB einzusetzende Mengen NCS, EDC-HCl und NHS pro 1 g Gelatine. 1 Äquivalent entspricht 0,266 mmol NH₂-Gruppen pro 1 g Gelatine.

| Funktionalisierungsgrad | Äquivalente (NCS) | n (NCS) [mmol] | V (NCS) [μl] | m (EDC) [mg] | m (NHS) [mg] |
|-------------------------|-------------------|----------------|--------------|--------------|--------------|
| Low | 1 | 0,266 | 32,6 | 102,0 | 30,6 |
| Medium | 2 | 0,532 | 65,1 | 204,0 | 61,2 |
| High | 10 | 2,66 | 325,5 | 1019,8 | 306,1 |

6.7.1.3 GeIS

Synthese von GeIS erfolgte unter Argonatmosphäre. In einem Schlenkkolben wurden 1 g Gelatine und eine Spatelspitze EDTA vorgelegt, der Kolben verschlossen und abwechselnd je dreimal evakuiert und mit Argon gespült. Anschließend wurden 10 ml Natriumcarbonat-Puffer (0,1 M, pH 10, entgast), bestehend aus 40 % 0,1 M Natriumhydrogencarbonat und 60 % 0,1 M Natriumcarbonat, zugegeben und bis zum vollständigen Lösen der Gelatine bei 40 °C gerührt. Das einzusetzende *N*-Acetylhomocysteinthiolacton (NHT) (Tabelle 8) wurde in wenig Puffer gelöst und über eine Spritze mit Kanüle zur Gelatinelösung gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 3 h unter Argonatmosphäre bei 40 °C gerührt und anschließend mit 10 ml ddH₂O verdünnt. Die Lösung wurde in Dialyseschläuche (Cellulose, Ausschlussgröße 12-14 kDa) überführt und für 24 Stunden gegen entgastes ddH₂O unter Schutzgasatmosphäre bei 40 °C dialysiert. Ein Wasserwechsel erfolgte alle 3 Stunden, wobei bei den ersten beiden Wechseln jeweils eine Spatelspitze EDTA zugegeben wurde. Bis zur Gefriertrocknung wurde die Lösung bei -80 °C in Falcons gelagert. GeIS wurde nach der Gefriertrocknung als weißer Feststoff erhalten und unter Argonatmosphäre bei -80 °C gelagert.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ/ppm = 7,6-7,4 (H_{aromat} Gelatine), 5,24-0,99 (Gelatine), 3,20 (bs, NH₂), 2,23 (s, CH₃).

Tabelle 8: Für die Synthese von GeIS einzusetzendes *N*-Acetylhomocysteinthiolacton pro 1 g Gelatine. 1 Äquivalent entspricht 0,266 mmol NH₂-Gruppen pro 1 g Gelatine.

| Funktionalisierungsgrad | Äquivalente (NHT) | n (NHT) [mmol] | m (NHT) [mg] |
|-------------------------|-------------------|----------------|--------------|
| Low | 1 | 0,266 | 42,4 |
| Medium | 5 | 1,33 | 211,8 |

6.7.2 Peptide

6.7.2.1 Boc-Schützung von Ethylendiamin und Diaminobutan

Die eingesetzten Monomere Ethylendiamin und *N*-1,4-Diaminobutan wurden vor der Festphasensynthese mit einer Boc-Schutzgruppe versehen. Hierzu wurden 400,2 mmol des jeweiligen Monomers in 240 ml THF in einem Rundkolben vorgelegt. Über 4 h wurden 60 mmol Di-*tert*-butydicarbonat (Boc₂O, 1 Äq., 13,1 g) in 135 ml THF zugetropft, anschließend wurde die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ende der Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 100 ml kaltem Wasser gelöst. Nach dem Abfiltrieren des entstandenen Feststoffes und dreimaligem Nachwaschen mit kaltem Wasser wurde die wässrige Phase vier Mal mit 50 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und zwei Mal mit je 30 ml Wasser und einmal mit 50 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, der Feststoff abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das geschützte Amin wurde als klare, viskose Flüssigkeit erhalten. Die genauen eingesetzten Mengen sind Tabelle 9 zu entnehmen. Die Lagerung des Produktes erfolgte bei 4 °C.

Tabelle 9: Boc-Schützung von *N*-1,4-Diaminobutan und Ethylendiamin.

| | Äquivalente | <i>n</i> [mmol] | <i>M</i> [g/mol] | <i>m</i> [g] | <i>V</i> [ml] |
|----------------------------|-------------|-----------------|------------------|--------------|---------------|
| Ethylendiamin | 6,67 | 400,2 | 60,07 | 24,04 | 26,7 |
| <i>N</i> -1,4-Diaminobutan | 6,67 | 400,2 | 88,15 | 35,38 | |
| Boc ₂ O | 1,0 | 60,0 | 218,25 | 13,1 | |

6.7.2.2 Festphasensynthese der Peptide

Die Synthese der Peptide erfolgte als Festphasensynthese an Rink-Amid-Harz. Als Reaktionsgefäß dienen 10 ml PP Reaktoren mit PE Fritte.

Quellen des Harzes und Abspaltung der Fmoc-Gruppe

Je 300 mg Fmoc-geschütztes Rink-Amid-Harz (Beladungsdichte 0,36 mmol/g) wurden in die Reaktoren eingewogen und über Nacht in 2,5 ml in DMF quellen gelassen. Für P7 wurden 100 mg in ein 10 ml Reaktor eingewogen, und mit 0,5 ml quellen gelassen. Nach dem Quellen wurde das DMF entfernt und die Fmoc-Gruppe abgespalten. Hierzu wurden dreimal je 1,5 ml Piperidin (20 % in DMF) zum Harz gegeben und für je 5 min geschüttelt. Nach den jeweiligen Reaktionszeiten wurde je dreimal mit je 1,5 ml DMF gewaschen.

Acylierung

Die Acylierung wurde mit für jede Spritze frisch angesetzter Bromessigsäure-Lösung durchgeführt. Hierzu wurden 120,9 mg Bromessigsäure (8,00 Äq., 0,87 mmol) in 1 ml DMF gelöst und mit 135 µl DIC (8,00 Äq., 0,87 mmol, 110,1 mg) versetzt. Die Acylierungsreaktion

erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln. Anschließend wurde dreimal mit je 1,5 ml DMF gewaschen.

Kupplung der Monomere

Die Kupplung der Monomere erfolgte in 1 ml DMF mit je 8,00 Äq. des zu kuppelnden Monomers für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln. In Tabelle 10 sind die eingesetzten Mengen gezeigt.

Tabelle 10: Für die Synthese der Peptoide eingesetzte Amine.

| | Äquivalente | <i>n</i> [mmol] | <i>M</i> [g/mol] | <i>m</i> [mg] | <i>V</i> [μl] |
|-------------------------------|-------------|-----------------|------------------|---------------|---------------|
| <i>Propargylamin</i> | 8,00 | 0,87 | 55,08 | 48 | 55,8 |
| <i>N-Boc-1,4-Diaminobutan</i> | 8,00 | 0,87 | 188,3 | 163,8 | |
| <i>N-Boc-Ethylendiamin</i> | 8,00 | 0,87 | 160,12 | 138,3 | |

Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde dreimal mit je 1,5 ml DMF gewaschen, um überschüssige Monomere zu entfernen. Die Monomerkupplung wurde im Wechsel mit der Acylierung so lange wiederholt, bis die gewünschte Länge des Peptoides erreicht war.

Abspaltung vom Harz

Nach Ende der letzten Monomerkupplung wurde die feste Phase acht Mal mit DCM gewaschen. Die Abspaltung der Peptoide vom Harz erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 3,0 ml 90 % TFA in DCM. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden die abgespaltenen Peptoide in Falcons überführt und das Harz zweimal mit DCM gewaschen. Zum Trocknen der Peptoide wurde die Abspatlösung mit Stickstoff bei Raumtemperatur abgedampft.

6.7.2.3 Reinigung der Peptide

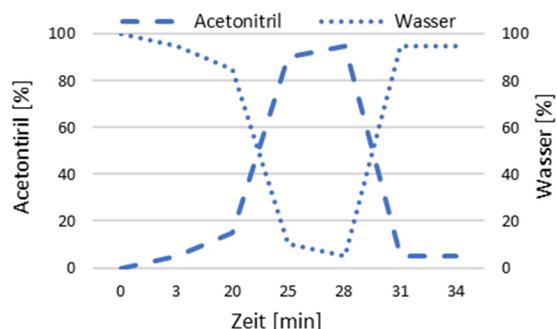
Die Reinigung der Peptide erfolgte durch HPLC mit anschließender Erfolgskontrolle durch MALDI-TOF-MS und ESI-MS.

HPLC

Für die Reinigung der Peptide an der PuriFlash 4215 HPLC von Interchim wurden die getrockneten Peptide in Acetonitril mit einigen Tropfen Wasser gelöst. Die Reinigung erfolgte mit dem in Tabelle 11 dargestellten Gradienten.

Tabelle 11: HPLC-Gradient für die Reinigung der Peptide

| Zeit [Min] | Acetonitril [%] | Wasser [%] |
|------------|-----------------|------------|
| 0-3 | 5 | 95 |
| 3-20 | 5-15 | 95-85 |
| 20-25 | 15-90 | 85-10 |
| 25-28 | 90-95 | 10-5 |
| 28-31 | 95-5 | 5-95 |
| 31-34 | 5 | 95 |



Massenspektrometrie

Zur Erfolgskontrolle der Synthese und Reinigung der Peptide wurden die HPLC-Fractionen auf die molare Masse der Peptide P1 und P3 mit MALDI-ToF-Massenspektrometrie untersucht. Als Matrix diente α -Cyano-Zimtsäure gelöst in 50 % Acetonitril (ACN), 0,2 % TFA und 49,8 % Wasser (1:100 CHCA/Matrixlösung). Je 0,5 μ L Matrix und 0,5 μ l Probe (aus HPLC-Fraktion) wurden auf einen Punkt einer Standardprobenplatte aufgetragen und an der Luft kristallisiert. Die Messung erfolgte im positiven Modus mit dem Massenspektrometer (UltrafleXtreme von Bruker Daltonik GmbH und 4800 Proteomics Analyser von Applied Biosystems).

Die Analyse der Fraktionen von P2 und P6 erfolgte auf Grund der geringen molaren Masse mit ESI-MS. Es erfolgte keine spezielle Probenvorbereitung. ESI-MS Gerät/Parameter

Die Fraktionen, welche das gewünschte Peptoid enthielten, wurden in 6-Well Platten überführt und bei Raumtemperatur durch Verdampfen getrocknet. Die trockenen Peptide wurden in wenig Isopropanol gelöst, in 2 mL Probengläschen überführt und bei 37 °C erneut getrocknet. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank.

6.8 Charakterisierung der Photopolymere

6.8.1 TNBSA-Assay

Die Bestimmung des Funktionalisierungsgrades von funktionalisierter Gelatine erfolgte durch den TNBSA-Assay. Zunächst wurden die zu analysierenden Gelatinederivate jeweils in 0,1 M Natriumcarbonatpuffer (pH 8,5) gelöst und verdünnt, sodass sie abschließend in einer Konzentration von 500 μ g/ml (200 μ g/ml Gelatine für die Bestimmung der freien

Aminogruppen) vorlagen. Für jedes zu analysierende Derivat wurden 2 ml dieser Lösung hergestellt. Für jede zu analysierende Lösung wurden 500 µl für den Blank entnommen und 2x 500 µL für den Nachweis der freien Aminogruppen. Zu den Blanks wurden jeweils 125 µL 1 M HCl gegeben. Anschließend wurden in alle Proben und die Blanks 250 µl 0,02 % TNBSA in Carbonatpuffer gegeben. Die Reaktion erfolgte dann für 4 h bei 37 °C. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden zu den Proben je 125 µl 1 M HCl gegeben. Anschließend wurden zu allen Blanks und Proben je 250 µl 10 % SDS gegeben. Je 1 ml der Lösungen wurde in eine Küvette überführt und die Absorption bei 335 nm bestimmt. Alle Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt. Der Funktionalisierungsgrad wurde mit folgender Formel berechnet:

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

6.9 Hydrogele ohne Vernetzer

6.9.1.1 Herstellung von GelMA-Hydrogelen

Zur Herstellung von GelMA-Hydrogelen wurde zunächst GelMA bei 40 °C in DPBS^{-/-} (10 % w/v) gelöst. Die Lagerung der Stammlösungen erfolgte für kurze Zeiten im Kühlschrank, vor jeder Verwendung wurde sie auf 40 °C erwärmt. Für weitere Experimente wurde die GelMA-Stammlösung mit LAP (10% w/v) und DPBS^{-/-} verdünnt, sodass eine Gelkonzentration von 5 % erhalten wurde. Die Zusammensetzung für 1 ml ist Tabelle 12 zu entnehmen. Die Zusammensetzung ist unabhängig vom Funktionalisierungsgrad.

Tabelle 12: Zusammensetzung von 1 ml GelMA.

| | Konzentration im Gel [%] | Volumen [µl] |
|---------------------|-----------------------------|-----------------|
| GelMA (10 %) | 5 | 500 |
| LAP (10 %) | 0,3 | 30 |
| DPBS ^{-/-} | | 470 |

Die Aushärtung der Gele erfolgte mit Licht der Wellenlänge 320-500 nm (500 mW/cm²) für 20 s.

6.9.1.2 Herstellung von GelNB/GelS-Hydrogelen

Die Herstellung von GelNB/GelS-Gelen erfolgte ebenfalls aus Stammlösungen. Hierzu wurde zunächst GelNB bei 40 °C in DPBS^{-/-} gelöst (10 % w/v). GelS wurde bei 60 °C in DPBS^{-/-} gelöst (5 % w/v). GelN wurde vor der Verwendung auf 40 °C erwärmt, GelS auf 60 °C. Abhängig vom Funktionalisierungsgrad wurden die Photopolymerlösungen hergestellt, mit LAP (10 % w/v) versetzt und für 5 s mit Licht der Wellenlänge 320-500 nm (500 mW/cm²) zum Hydrogel ausgehärtet. Die genaue Zusammensetzung für 1 ml Lösung ist Tabelle 13 zu entnehmen. Die Lagerung der Stammlösungen erfolgte für kurze Zeiten im Kühlschrank.

Tabelle 13: Zusammensetzung von 1 ml GelNB/GelS-Hydrogel.

| | | Konzentration im Gel [%] | Volumen [μ l] |
|---------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| <i>Low</i> | GelNB <i>Low</i> (10 %) | 5 | 250 |
| | GelS <i>Low</i> (5 %) | 5 | 500 |
| | LAP (10 %) | 0,03 | 3 |
| | DPBS ^{-/-} | | 247 |
| <i>Medium</i> | GelNB <i>Medium</i> (10 %) | 5 | 250 |
| | GelS <i>Medium</i> (5 %) | 5 | 500 |
| | LAP (10 %) | 0,03 | 3 |
| | DPBS ^{-/-} | | 247 |
| <i>High</i> | GelNB <i>High</i> (10 %) | 5 | 172 |
| | GelS <i>Medium</i> (5 %) | 5 | 655 |
| | LAP (10 %) | 0,03 | 3 |
| | DPBS ^{-/-} | | 170 |

6.9.2 Bestimmung der optimalen Aushärtungsbedingungen

Für die Polymerisation der Hydrogele wurde LAP als Photoinitiator eingesetzt. Die Konzentration der verwendeten Stammlösung betrug 10 % (w/v), vor der Verwendung wurde diese auf 75 °C erhitzt.

Zur Bestimmung der optimalen Aushärtungsbedingungen für die Hydrogele ohne Vernetzer wurden Photopolymerlösungen wie in Kapitel 6.9 angesetzt. Die enthaltene Konzentration LAP wurde variiert (0,3 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,03 %, 0,01 %). Jeweils 70 μ l der Lösung wurden in ein Well einer 96-Well Platte gegeben und mit dem Omnicure S2000 bestrahlt. In Zeitabständen von 2-5 Sekunden wurde die Aushärtung überprüft. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt.

6.10 Hydrogele mit Vernetzer

6.10.1 Herstellung von Hydrogelen mit Vernetzer

Für die Herstellung von Hydrogelen mit GelS *Medium* und verschiedenen Peptoiden und PEGDA als Vernetzer wurden zunächst Stammlösungen für GelS (6,95 % w/v), die Peptide (28 mM) und PEGDA (250 mM) in DPBS^{-/-} angesetzt. GelS wurde bei 60 °C gelöst, die Peptide und PEGDA durch Vortexen bei Raumtemperatur. Die Lagerung der Stammlösungen erfolgte für kurze Zeiten im Kühlschrank. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Lösungen ist Tabelle 14 zu entnehmen. Die Aushärtung erfolgte mit 320-500 nm unter den in Tabelle 14 angegebenen Bedingungen.

Tabelle 14: Zusammensetzung von 1 mL Hydrogel mit Vernetzer. Für die Zelleexperimente wurde für alle Hydrogele 0,3 % LAP verwendet, für die Bestimmung der physikalischen Eigenschaften wurden 0,1 % LAP verwendet, sodass die Polymerisation immer gewährleistet war. Eine feste Polymerisationszeit wurde nicht festgelegt, es wurde solange bestrahlt bis die Polymerisation erkennbar war.

| | | Konzentration im Gel [%] | Volumen [μ l] | Intensität [mW/cm ²] |
|-------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| <i>GeIS/P1</i> | <i>GeIS Medium</i> (6,95 %) | 5 | 719 | 1000 |
| | P1 (28 mM) | 3,5 | 125 | |
| | LAP (10 %) | 0,3 | 30 | |
| | DPBS ^{-/-} | | 126 | |
| <i>GeIS/P2</i> | <i>GeIS Medium</i> (6,95 %) | 5 | 719 | |
| | P2 (28 mM) | 3,5 | 125 | |
| | LAP (10 %) | 0,03 | 3 | |
| | DPBS ^{-/-} | | 153 | |
| <i>GeIS/P3</i> | <i>GeIS Medium</i> (6,95 %) | 5 | 719 | |
| | P3 (28 mM) | 3,5 | 125 | |
| | LAP (10 %) | 0,1 | 10 | |
| | DPBS ^{-/-} | | 146 | |
| <i>GeIS/P6</i> | <i>GeIS Medium</i> (6,95 %) | 5 | 719 | |
| | P6 (28 mM) | 3,5 | 125 | |
| | LAP (10 %) | 0,03 | 3 | |
| | DPBS ^{-/-} | | 153 | |
| <i>GeIS/PEGDA</i> | <i>GeIS Medium</i> (6,95 %) | 5 | 719 | |
| | PEGDA (250 mM) | 15 | 60 | |
| | DPBS ^{-/-} | | 211 | |
| | LAP (10 %) | 0,1 | 10 | |

6.10.2 Bestimmung der optimalen Aushärtungsbedingungen

Die Bestimmung der optimalen Aushärtungsbedingungen der Hydrogele mit Vernetzern erfolgte durch Variieren der Vernetzer-Konzentration, der LAP-Konzentration und der Intensität des eingesetzten Lichtes. Zunächst wurde ermittelt, mit welcher Vernetzer-Konzentration sich eine kurze Polymerisationszeit erreichen lässt bei der Verwendung von

0,3 % LAP und 500 mW/cm². Die Konzentration wurde von 7 mM bis 3,5 mM in 0,5 mM Schritten variiert, wobei 3,5 mM Vernetzer der äquimolaren Menge an Thiolgruppen in Gels entsprach. Anschließend wurde analysiert, ob sich die Polymerisationszeit durch Erhöhung der Strahlungsintensität verkürzen lässt. Es wurden Intensitäten von 500 mW/cm² bis 5000 mW/cm² getestet (von 500-1500 mW/cm² in 100er Schritten, von 2000-5000 mW/cm² in 1000er Schritten), mit den Vernetzer-Konzentrationen 3,5 und 7 mM. Zuletzt wurde mit den Strahlungsintensitäten 500, 1000 und 2000 mW/cm² überprüft, ob die LAP-Konzentration gesenkt werden kann. Analysiert wurde die Aushärtung für die LAP-Konzentrationen 0,01-0,3 % mit je 3,5 mM und 7 mM Peptoid. Die Bestimmung der Polymerisationszeit erfolgte in Triplikaten. Die Polymerisation galt als vollständig, sobald optisch erkennbar war, dass sich ein Gel gebildet hat. Die Herstellung der Hydrogellösungen erfolgte wie oben beschrieben aus einer Gels Medium-Stammlösung (6,95 % w/v), einer Peptoid-Stammlösung (28 mM)/PEGDA-Stammlösung (1 M) und dem Zusatz von LAP (10 % w/v oder 1 % w/v) und DPBS^{-/-}. Die Lösungen wurden jeweils in Triplikaten als 50 µl Tropfen auf PDMS-beschichtete Objektträger pipettiert und mit dem Omnicure S2000 (320-500 nm) mit einem Abstand von 5 cm zwischen Lichtleiter und Probe bestrahlt. In Tabelle 10 sind die analysierten Bedingungen dargestellt.

Tabelle 15: Bedingungen für die durchgeführten Aushärtungstests. Die jeweils variierte Bedingung ist in fett dargestellt.

| | <i>c Gels</i> [%] | <i>c Peptoid</i> [mM] | <i>c LAP</i> [%] | <i>Intensität</i> [mW/cm ²] |
|---------------------------------------|----------------------|--------------------------|-----------------------------|--|
| <i>c Peptoid [mM]</i> | 5 | 7-3,5 | 0,3 | 500 |
| <i>c LAP [%]</i> | 5 | 3,5 | 0,3 | 500-5000 |
| <i>Intensität [mW/cm²]</i> | 5 | 3,5 | 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 | 1000 |

6.10.3 Bestimmung freier Thiole nach der Aushärtung – Hydrogele mit Vernetzer

Mit dem Ellman-Assay wurden die freien Thiolgruppen in polymerisierten Hydrogelen mit Vernetzern bestimmt. Je 100 µl der Hydrogelvorläuferlösung wurden wie in Kapitel 6.10 beschrieben auf mit PDMS beschichteten Objektträgern ausgehärtet. Als Kontrolle dienten Tropfen aus 100 µl Photopolymerlösung von GelS, welche für 20 Minuten bei 4 °C geliert wurden. Alle Tropfen wurden in eine 24-Well Platte überführt und der Gehalt freier Thiolgruppen nach dem Protokoll von Thermo Fisher Scientific ermittelt.²⁶⁰ Die Tropfen wurden für 6 Stunden bei Raumtemperatur in Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4, 1 mM EDTA) mit Ellman's Reagenz (0,2 mM) im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 200 µL der Lösung in eine 96-Well Platte überführt und die Absorption bei 412 nm gemessen (Spectra Max ID3, Molecular Devices). Der Anteil freier Thiolgruppen wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Freie Thiolgruppen} = \frac{A_{\text{Hydrogel}}}{A_{\text{GelS}}} \times 100 \%$$

6.10.4 Analyse des Quellverhaltens von Hydrogelen mit Vernetzer

Das Quellverhalten der Hydrogele mit Vernetzern wurde nach Noshadi et al. gravimetrisch bestimmt.²³⁴ Je 200 µl der Hydrogelvorläuferlösung (5 % Gel, 3,5 mM Vernetzer, 0,1 % LAP) wurden auf einen mit PDMS beschichteten Objektträger gegeben und für 30 s mit dem Omnicure S2000 mit 1000 mW/cm² ausgehärtet. Zur Bestimmung des Trockengewichtes m_{dry} wurden die Hydrogele zunächst bei -20 °C eingefroren und anschließend für 24 Stunden lyophilisiert. Mit einer Feinwaage wurde das Trockengewicht bestimmt und die Tropfen danach zum Quellen in 2 ml DPBS^{-/-} eingelegt. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden Tropfen entnommen, überschüssige Flüssigkeit mit einem Papiertuch entfernt und die Masse der Tropfen m_{wet} mit einer Feinwaage bestimmt. Der Flüssigkeitsgehalt der Tropfen wurde nach Lou et al.²³⁵ berechnet:

$$\text{Flüssigkeitsgehalt} = \frac{m_{\text{wet}} - m_{\text{dry}}}{m_{\text{wet}}} \times 100 \%$$

Die swelling ratio wurde nach Noshadi et al.²³⁴ berechnet:

$$\text{swelling ratio} = \frac{m_{\text{wet}}}{m_{\text{dry}}}$$

6.10.5 Degradation von Hydrogelen mit Vernetzern

Der Abbau der Hydrogele wurde nach Noshadi et al.²³⁴ analysiert. Hierzu wurden je 200 µl Hydrogelvorläuferlösung ((5 % Gel, 3,5 mM Vernetzer, 0,1 % LAP mit DMEM oder 10 % FCS in DPBS^{-/-}) auf einem mit PDMS beschichteten Objektträger polymerisiert. Nach dem Lyophilisieren wurde das Trockengewicht der Tropfen bestimmt und die Tropfen in 1 ml Flüssigkeit (DMEM oder 10 % FCS in DPBS^{-/-}, steril) gegeben und für 24, 48, 72, 96 Stunden,

7 Tage und 14 Tage bei 37 °C inkubiert. Alle zwei Tage wurde die Flüssigkeit unter sterilen Bedingungen erneuert. Für jeden Zeitraum wurde ein einzelner Tropfen hergestellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der jeweilige Tropfen entnommen, eingefroren und anschließend lyophilisiert. Das Trockengewicht wurde mit einer Feinwaage ermittelt. Der verbleibende Anteil der Tropfen wurde nach Noshadi *et al.*²³⁴ bestimmt:

$$\text{verbleibender Anteil} = \frac{m_{t0}}{m_t} \times 100 \%$$

6.11 Rheologie

6.11.1 Geliertemperatur

Zur Auswahl der zu messenden Temperaturbereiche wurden die zu analysierenden Lösungen in einem Vorversuch bei definierten Temperaturen auf optisch erkennbare Gelierung untersucht. Je 500 µl der jeweiligen Lösung wurden in einem Eppendorf Reaktionsgefäß auf eine definierte Temperatur gebracht und die Gelierung beurteilt. Für nicht-autoklavierte Lösungen wurden die Temperaturen 37 °C, 30 °C, 25 °C, 23 °C und 20 °C festgelegt, für autoklavierte Lösungen wurden zusätzlich die Temperaturen 17 °C und 15 °C betrachtet.

Die Bestimmung der Geliertemperatur erfolgte an einem Rheometer der Firma Anton Paar (Physica MCR 501) mit einer konischen Messplatte mit dem Durchmesser 35 mm (CP35/3 Messplatte, Anton Paar). Es wurden 100 Messpunkte mit einer konstanten Deformation von 0,1 % und einer konstanten Frequenz von 10 rad/s aufgezeichnet. Die Abkühlrate betrug 0,6 °C/min. Für die nicht-autoklavierten Lösungen wurde ein Temperaturbereich von 32 °C bis 14 °C untersucht, für Gelatine und GelMA8.0 wurde ein Temperaturbereich von 25 °C bis 7 °C gewählt, für GelBN/GelS *Medium* von 15 °C bis 3 °C.

6.11.2 Scherviskosität und Fließgrenze – GelMA, GelNB/GelS

Für die Vorläuferlösungen GelMA und GelNB/GelS wurden die Scherviskosität und die Fließgrenze der Lösungen bei 14 °C in Triplikaten bestimmt. Hierzu wurden die Lösungen wie in Tabelle 7 und Tabelle 8 angesetzt und bis zur Messung bei 4 °C gelagert. Die Messung erfolgte an einem Platte-Platte-Rheometer (HAAKE RheoScope 1, Thermo Fisher Scientific) mit einer Messplatte mit dem Durchmesser 20 mm (PP20 Messplatte, Anton Paar) und einer Messdistanz von 1 mm. Scherviskosität und Fließgrenze wurden in einem Rotationsversuch über einen Scherratenbereich von 0,1-1000 s⁻¹ (Scherviskosität) und einen Schubspannungsbereich von 1-1000 Pa (Fließgrenze) bestimmt. Es wurden 100 Messpunkte (Scherviskosität) beziehungsweise 78 Messpunkte (Fließgrenze) mit einer konstanten Messpunktdauer aufgezeichnet.

6.11.3 Viskoelastische Eigenschaften von GelS/P1

Für die Bestimmung der rheologischen Eigenschaften des GelS/P1-Hydrogele wurden Hydrogele mit einem Durchmesser von 25 mm hergestellt. Hierzu wurden je 500 µl

Hydrogellösung (5 % Gel, 3,5 mM Vernetzer, 0,1 % LAP) in ein Well einer 12-Well Platte pipettiert und mit den in Tabelle 9 genannten Bedingungen polymerisiert. Die Gele wurden mit 1 ml DPBS^{-/-} überschichtet und für 2 h bei 4 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Gele aus der Kühlung entnommen und die Hälfte der Flüssigkeit abgenommen. Mit Hilfe eines Spatels wurden die Gele in je einen Deckel einer 35 mm Petrischale überführt und mit 0,5-1 ml DPBS^{-/-} überschichtet. Um die Gele bis zur Messung vor Austrocknung zu schützen wurden die Deckel mit der zugehörigen Petrischale verschlossen und die Gele im Kühlschrank aufbewahrt. Die Messung der viskoelastischen Eigenschaften der polymerisierten Gele erfolgte bei 37 °C. Für die polymerisierten Gele wurden Speicher- und Verlustmodul (G' und G'') und die Fließgrenze bestimmt. Die Messung erfolgte an einem Platte-Platte-Rheometer (HAAKE RheoScope 1, Thermo Fisher Scientific) mit einer Messplatte mit dem Durchmesser 20 mm (PP20 Messplatte, Anton Paar) und einer Messdistanz von 1 mm. Die Messungen erfolgten in Triplikaten.

6.11.4 Scherviskosität und Fließgrenze - Gels/P1

Für die Lösungen (angesetzt nach Tabelle 14, statt Photoinitiator wurde DPBS^{-/-} zugegeben) wurde bei 14 °C G'/G'' , die Fließgrenze und die Scherviskosität bestimmt. G' und G'' wurden in einer dynamischen Oszillationsmessung mit einer konstanten Amplitude von 3 Pa über einen Frequenzbereich von 100-0,1 rad/s bestimmt. Es wurden 28 Messpunkte mit einer logarithmisch ansteigenden Messpunktdauer aufgezeichnet. Scherviskosität und Fließgrenze wurden in einem Rotationsversuch über einen Scherratenbereich von 0,1-1000 s⁻¹ (Scherviskosität) und 1,0-1000 s⁻¹ (Fließgrenze) bestimmt. Es wurden 100 Messpunkte (Scherviskosität) beziehungsweise 75 Messpunkte (Fließgrenze) mit einer konstanten Messpunktdauer aufgezeichnet. Die Messungen erfolgten in Triplikaten.

6.11.5 Speichermodul von Hydrogelen mit Vernetzer - ElastoSens Bio

Für die Gele mit Vernetzer wurde der Speichermodul G' mit dem ElastoSens Bio kontaktlos ermittelt. Die Messung erfolgte für die Lösungen bei 14 °C und für ausgehärtete Gele bei 37 °C. Zur Messung des Speichermoduls wurden 7 ml der Lösung (5 % Gel, 3,5 mM Vernetzer, 0,1 % LAP) in den Probenhalter des ElastoSens Bio gegeben und im Gerät für 30 Minuten temperiert. Die Messung erfolgte für mindestens 60 min bei 14 °C. Alle 10 s wurde ein Messpunkt aufgezeichnet. Anschließend wurde die Polymerlösung auf 37 °C erwärmt und die Messung des Speichermoduls erneut gestartet. Während der Messung wurde die Probe zur Polymerisation mit Licht der Wellenlänge 365 nm und 385 nm bestrahlt (85 % Leistung der integrierten LED). Alle 10 s wurde ein Messpunkt aufgezeichnet.

6.12 Diffusion in Hydrogele ohne Vernetzer

Die Beurteilung der Diffusion einer Farbstofflösung in Hydrogelwürfel (1 cm^3) wurde qualitativ bewertet. Hierzu wurden Photopolymer- und Hydrogellösungen wie oben beschrieben angesetzt (Kapitel 6.9). Für jeden Würfel wurde 1 ml der jeweiligen Lösung in die Gussform pipettiert und von jeder Seite für 15 s bestrahlt. Die Würfel wurden mit Hilfe eines feinen Drahtes und eines Stempels aus der Form entnommen und in einer Methylenblaulösung (24,9 mM) eingelegt. Zu bestimmten Zeitpunkten (10 Minuten (nur GelMA), 20 min, 40 min, 60 min, 90 min, 120 Minuten, 180 min, 240 min) wurden die Würfel entnommen, bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren und anschließend lyophilisiert. Die trockenen Würfel wurden in der Mitte aufgeschnitten, und die Schnittkante fotografisch dokumentiert (Nikon D5100, Nikkor Objektiv 18-105 mm, Zoom 75, Abstand 47 cm). Die Auswertung, wann der Kern des Würfels vollständig blau gefärbt ist erfolgte mit dem webbasierten Tool Image Color Summarizer (<http://mkweb.bcgsc.ca/color-summarizer/?analyze>) mit 4-12 Farbclustern und einer Genauigkeit von 200 px. Die Bestimmung erfolgte aus je einem Würfel.

6.13 Autoklavieren von Photopolymerlösungen zur Sterilisation

Alle in der Analyse der Sterilisation eingesetzten Photopolymere stammten aus der gleichen Synthese. Als Vergleich wurde jeweils die nicht-autoklavierte Variante herangezogen.

6.13.1 Probenvorbereitung

Zur Bestimmung des Volumenverlustes während des Autoklavierens wurden in Probengläschen mit einem Volumen von 2 ml Lösungen der Photopolymere GelMA (10 % w/v), GelNB (10 % w/v) und GelS (5 % w/v) in DPBS^{-/-} hergestellt und die Masse der Probengläschen inklusive der darin enthaltenen Lösung bei Raumtemperatur bestimmt. Die Probengläschen wurden anschließend mit angedrehtem Deckel in einem mit Alufolie verschlossenen Becherglas aufrecht autoklaviert (15 min, $121 \text{ }^\circ\text{C}$). Nach dem Autoklavieren wurden die Gläschen unter sterilen Bedingungen vollständig verschlossen. Es wurde erneut die Masse bei Raumtemperatur bestimmt. Aus der Differenz der Masse vor und nach dem Autoklavieren wurde das Volumen bestimmt, welches während des Prozesses verdampft ist. Die Lösungen wurden auf $40 \text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt und das fehlende Volumen unter sterilen Bedingungen zugegeben.

Für das Bestimmen des Funktionalisierungsgrades vor und nach dem Autoklavieren wurden in Probengläschen Lösungen der Photopolymere GelMA (10 % w/v), GelNB (10 % w/v) und GelS (5 % w/v) in Natriumcarbonatpuffer für den TNBSA-Assay angesetzt. Es wurde die Masse der befüllten Probengläschen (2 ml) bestimmt und die Gläschen wie oben beschrieben autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden die Probengläschen verschlossen und die Masse erneut bestimmt. Aus der Differenz der Massen vor und nach dem Autoklavieren wurde

das verdampfte Volumen bestimmt. Das fehlende Volumen wurde mit Natriumcarbonatpuffer für den TNBSA-Assay aufgefüllt und die Lösungen auf 40 °C erwärmt.

Zur Bestimmung des Einflusses auf die viskoelastischen Eigenschaften Speicher- und Verlustmodul wurden Lösungen wie oben beschrieben angesetzt, jedoch in Probengläschen mit einem Volumen von 4 ml. Es wurde ebenfalls die Massendifferenz vor und nach dem Autoklavieren bei Raumtemperatur bestimmt und das fehlende Volumen mit DPBS^{-/-} aufgefüllt und die Lösungen auf 40 °C erwärmt, um eine vollständige Durchmischung der Lösung zu erreichen. Alle Probengläschen wurden maximal bis zur Hälfte ihres Volumens befüllt um ein Überkochen während des Autoklavierens zu verhindern.

6.13.2 Einfluss auf den Funktionalisierungsgrad und die Aushärtung

Zur Analyse des Funktionalisierungsgrades vor und nach dem Autoklavieren wurde der TNBSA-Assay wie in Kapitel 6.8.1 beschrieben durchgeführt. Die Proben wurden als zu verdünnende Lösung von 10 % (GelMA und GelNB) und 5 % (GelS), Gelatine in einer Konzentration von 100 mg/ml angesetzt. Ein Teil der Proben wurde autoklaviert. Zur Bestimmung der freien Aminogruppen vor und nach dem Autoklavieren wurde der TNBSA-Assay mit einer Gelatinelösung der Konzentration 200 µg/ml durchgeführt.

Mit den für den TNBSA-Assay hergestellten Lösungen wurden zusätzlich Aushärtungstests durchgeführt. Für GelNB/GelS wurden folgende Kombinationen getestet: GelNB⁺ mit GelS⁺, GelNB⁻ mit GelS⁺, GelNB⁺ mit GelS⁻. Als Vergleich diene jeweils das nicht autoklavierte Photopolymer. Für jedes Hydrogel wurden 150 µl Lösung wie in Kapitel 6.9 beschrieben angesetzt und in 50 µl Tropfen auf PDMS-beschichteten Objektträgern mit dem Omnicure S2000 ausgehärtet. Es galt, dass sich die Lösung zum Hydrogel polymerisieren ließ, sodass dieses für 2 Stunden bei 37 °C in PBS stabil war. (+) = autoklaviert, (-) = nicht-autoklaviert.

6.13.3 Einfluss auf die viskoelastischen Eigenschaften

Für die Bestimmung von Speicher- und Verlustmodul von GelMA und GelNB/GelS Hydrogelen wurden je 500 µl der Vorläuferlösung (autoklaviert oder nicht-autoklaviert) in ein Well einer 12-Well Platte gegeben und unter den oben genannten Bedingungen (Tabelle 7 und Tabelle 8) ausgehärtet. Die Gele wurden mit 1 ml DPBS^{-/-} überschichtet und für 2 h im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden die Gele auf den Deckel einer 35 mm Petrischale überführt, mit DPBS^{-/-} benetzt und bis zur Messung im Kühlschrank aufbewahrt. Die Messung der viskoelastischen Eigenschaften G' und G'' erfolgte bei 37 °C in Triplikaten an einem Platte-Platte-Rheometer (HAAKE RheoScope 1, Thermo Fisher Scientific) mit einer Messplatte mit dem Durchmesser 20 mm (PP20 Messplatte, Anton Paar) und einer Messdistanz von 1 mm. G' und G'' wurden in einer dynamischen Oszilationsmessung mit einer konstanten Amplitude von 3 Pa über einen Frequenzbereich von 0,1-100 rad/s. Es wurden 28 Messpunkte mit

logarithmisch ansteigender Messpunktdauer aufgezeichnet. Für GelNB/GelS *Low* autoklaviert konnten keine Messwerte aufgezeichnet werden.

6.13.4 Bestimmung der Sterilität

Die Bestimmung der Sterilität erfolgte durch Auftragen der Hydrogellösungen auf Agar-Platten und anschließender Inkubation bei 37 °C. Hierzu wurden je 50 µl der jeweiligen Hydrogelvorläuferlösung (autoklaviert, unsteril eingewogen, steril eingewogen und gezielt verunreinigt) auf die Agar-Platte (1,5 % Agar in LB-Medium) pipettiert und mit Glaskügelchen verteilt. Unsteril eingewogene Lösungen wurden in unsterilem DPBS^{-/-} gelöst, steril eingewogene Lösungen wurden mit Handschuhen eingewogen und in sterilem DPBS^{-/-} unter sterilen Bedingungen gelöst, verunreinigte Lösungen wurden gezielt durch Kontakt mit Oberflächen verunreinigt. Die steril eingewogenen Proben wurden in sterilem DPBS^{-/-} unter der Sterilbank gelöst, unsterile Proben wurden in unsterilem DPBS^{-/-} in normaler Raumluft eingewogen. Die verunreinigten Proben wurden gezielt an Türklinken und Fußböden verunreinigt und ebenfalls in unsterilem DPBS^{-/-} eingewogen. Zusätzlich wurde das eingesetzte DPBS^{-/-} auf Agarplatten ausplattiert, um auszuschließen, dass eine Verunreinigung durch das Lösungsmittel verursacht wurde. Nach 48 Stunden wurden die Platten fotografisch dokumentiert. Als steril galten solche Platten, die keine Kolonien zeigten.

6.14 Zellkultur

6.14.1 Kultivierung von HepG2

Die Kultivierung von HepG2 erfolgte adhärent in DMEM mit 10 % FCS und 1 % P/S bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen (75 cm²). Zur Kultivierung wurden die Zellen aus der Lagerung bei -196 °C entnommen. Im sterilen Umfeld wurde das Vial geöffnet, um darin enthaltenen Stickstoff entweichen zu lassen. Anschließend wurden die Zellen für 60 s im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und anschließend in eine Zellkulturflasche (75 cm²) mit vorgewärmtem DMEM überführt. Um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen wurde nach 24 Stunden ein Mediumwechsel durchgeführt. Hierzu wurde das enthaltene Medium abgesaugt, die Zellen mit DPBS^{-/-} gewaschen und frisches DMEM zugegeben. Das Passagieren der Zellen erfolgte bei Erreichen eines konfluenten Wachstums 1:10 oder 1:5. Hierzu wurde das enthaltene Medium abgesaugt, der Zelllayer mit 10 ml DPBS^{-/-} gewaschen und anschließend für 5 min mit 1 ml Trypsin EDTA (0,25 %) im Inkubator von der Zellkulturflasche abgelöst. Das Ablösen wurde durch Klopfen vervollständigt und unter dem Mikroskop überprüft. Die Enzymreaktion wurde mit 9 ml DMEM gestoppt. Das gewünschte Volumen Zellsuspension wurde in eine neue, mit frischem vorgewärmtem DMEM befüllte, Zellkulturflasche überführt.

6.14.2 Kultivierung von NHDF

Die Kultivierung von NHDF erfolgte adhärent in DMEM mit 10 % FCS und 1 % P/S bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen (175 cm²). Die Zellen wurden zur Kultivierung aus der Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C entnommen und das Vial unter sterilen Bedingungen geöffnet um enthaltenen flüssigen Stickstoff entweichen zu lassen. Anschließend wurden die Zellen für 60 s im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in eine Zellkulturflasche mit vorgewärmtem DMEM überführt. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen. Für den Mediumwechsel wurde das enthaltene Medium abgesaugt, die Zellen mit 20 ml DPBS^{-/-} gewaschen und neues DMEM zugegeben. Wenn ein konfluentes Wachstum erreicht war, wurden die Zellen 1:3 passagiert. Hierzu wurde das Medium abgenommen und der Zelllayer mit 20 ml DPBS^{-/-} gewaschen. Das Ablösen der Zellen von der Flasche erfolgte durch Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA (0,25 %) für 5-10 min im Inkubator. Durch Klopfen wurde das Ablösen vervollständigt. Die Enzymreaktion wurde mit 7 ml DMEM gestoppt und die Zellsuspension auf drei neue Zellkulturflaschen (175 cm²) mit frischem DMEM aufgeteilt.

6.14.3 Einfrieren von HepG2 und NHDF

Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -196 °C in Einfriermedium, bestehend aus 50 % FCS, 40 % DMEM und 10 % DMSO. Vor dem Einfrieren wurden die Zellen wie oben beschrieben gewaschen und trypsinisiert. Die Enzymreaktion wurde mit dem jeweiligen Kultivierungsmedium gestoppt und die Zellsuspension vollständig in ein Falcontube überführt. Anschließend wurde mit einer Neubauer-Zählkammer die enthaltene Zellzahl bestimmt. Die Zellsuspension wurde bei 1200 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810R, Rotor A-4-81) für 2 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in Einfriermedium resuspendiert, sodass eine Konzentration von 1x10⁶ Zellen/ml erhalten wurde. Je 1 ml wurde in ein Cryovial überführt und die Zellsuspension in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter mit 1 °C/Min auf -80 °C gebracht. Nach Erreichen der -80 °C wurden die Zellen in den Stickstofftank (-196 °C) überführt.

6.14.4 Kultivierung von HUVEC

Die Kultivierung von HUVEC erfolgte in EGM-2-Ready-to-use mit 10 % FCS und 1 % P/S bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit adhärent in Zellkulturflaschen (75 cm²). Zur Kultivierung der HUVEC wurden diese aus der Lagerung bei -196 °C entnommen und das Cryovial unter sterilen Bedingungen geöffnet um enthaltenen Stickstoff entweichen zu lassen. Die Zellen wurden für 60 s bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in 3 ml vorgewärmten Trypsininhibitor (10 % FCS, 90 % DPBS^{-/-}) überführt. Um im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen wurden die Zellen für 2 Min mit 1200 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810R, Rotor A-4-81) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 1 ml

vorgewärmtem EGM-2 resuspendiert und eine Zellkulturflasche mit 9 ml vorgewärmtem EGM-2 gegeben. Bei Erreichen einer konfluenten Zellschicht wurden die Kulturen 1:3 gesplittet. Hierzu wurden das Zellkulturmedium entnommen und der Zelllayer mit 10 ml DPBS^{-/-} gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 ml Trypsin-EDTA (0,25 %) + 0,5 ml DPBS^{-/-} von der Zellkulturflasche abgelöst (3-5 min im Inkubator). Das Ablösen wurde unter dem Mikroskop überprüft, durch Klopfen vervollständigt und die Enzymreaktion mit 2 ml Trypsininhibitor gestoppt. Die Zellen wurden in ein Falcon überführt und die Flasche zweimal mit je 2 ml EGM-2 nachgespült und ebenfalls in das Falcon überführt. Anschließend folgte eine Zentrifugation mit 1200 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810R, Rotor A-4-81) für 2 min. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml EGM-2 resuspendiert. Die gewünschte Menge HUVEC wurde abschließend in eine mit frischem EGM-2 befüllte Zellkulturflasche gegeben.

6.14.5 Einfrieren von HUVEC

Die Lagerung der HUVEC erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196 °C in Einfriermedium bestehend aus 50 % FCS, 40 % EGM-2 und 10 % DMSO. Vor dem Einfrieren wurden die HUVEC wie oben beschrieben gewaschen und trypsinisiert. Nach dem Trypsinieren wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen zentrifugiert (1200 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810R, Rotor A-4-81), 2 min). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in Einfriermedium resuspendiert, sodass eine Zellkonzentration von 1×10^6 HUVEC/ml erhalten wurde. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in ein Cryovial überführt und die Zellen mit 1 °C/Min auf -80 °C gebracht. Nach Erreichen der -80 °C wurden die Vials in den Stickstofftank überführt.

6.14.6 Kultivierung von HA und HBVP

Zur Kultivierung von HA sowie HBVP wurden die Zellkulturflaschen (75 cm²) über Nacht im Inkubator mit Poly-L-Lysin (2 µg/cm² in ddH₂O) beschichtet und anschließend einmal mit DPBS^{-/-} gewaschen. Die Kultivierung von HA erfolgte in AM mit 1 % P/S und AGS-Zusätzen. Die Kultivierung von HBVP erfolgte in PM mit 1 % P/S und PGS-Zusätzen. Die Zellen wurden aus der Lagerung bei -196 °C entnommen und für 60 s bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in eine beschichtete, mit dem jeweiligen vorgewärmten Zellkulturmedium befüllte Flasche überführt. Nach frühestens 3 h erfolgte ein Mediumwechsel, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen. Bei Erreichen einer konfluenten Zellschicht wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das Medium abgenommen, einmal mit DPBS^{-/-} gewaschen und Trypsin/EDTA (0,25 %) zugegeben. Die Enzymreaktion wurde nach 3-5 min mit Trypsininhibitor gestoppt und die abgelösten Zellen in ein Falcon überführt. Es wurde zweimal mit Medium nachgespült, um die abgelösten Zellen zu sammeln. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension bei 300xg für 2 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in der gewünschten Menge resuspendiert. Die Zellen wurden

dann zur weiteren Kultivierung auf Zellkulturflaschen mit frischem Medium aufgeteilt oder für Versuche verwendet.

6.14.7 Kultivierung von hCMEC/D3

Die zur Kultivierung von hCMEC/D3 verwendeten Zellkulturflaschen (75 cm²) wurden für 60 Min mit 5 ml Kollagen (0,1 mg/ml in ddH₂O) im Inkubator beschichtet, anschließend wurde einmal mit DPBS⁻ gewaschen. Die Kultivierung von hCMEC/D3 erfolgte in EBM-2 mit 1 % P/S, 2,5 % FCS, 0,55 µM Hydrocortison und je 0,025 % Ascorbinsäure, bFGF, EGF, IFG-1 und VEGF.

Die Zellen wurden zunächst aus der Lagerung bei -196 °C entnommen, im Wasserbad für 60 s aufgetaut und die Zellsuspension anschließend in eine Zellkulturflasche mit spezifischem vorgewärmtem Zellkulturmedium überführt. Nach frühestens 3 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Bei Erreichen einer konfluenten Zellschicht wurden die hCMEC/D3 mit Trypsin/EDTA (0,25 %) von der Zellkulturflasche abgelöst und die Enzymreaktion nach 3-5 min mit Trypsininhibitor gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon überführt und die Flasche mit wenig Kultivierungsmedium ausgespült um alle abgelösten Zellen zu sammeln. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension für zwei Min bei 300xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in der gewünschten Menge zellspezifischem Kultivierungsmedium resuspendiert. Die Zellen wurden zur weiteren Kultivierung auf Zellkulturflaschen mit frischem Zellkulturmedium aufgeteilt oder in Experimenten eingesetzt.

6.14.8 Humane Neuronen

Eine Subkultivierung der humanen Neuronen war nicht möglich. Diese wurden nach Angaben des Herstellers aufgetaut und direkt für den Aufbau eines BBB-Modells mit dem 3D-Bioprinter eingesetzt.

6.15 MTT-Assay zur Bestimmung von Zytotoxizität

Zur Bestimmung der Zytotoxizität relativ zu einer unbehandelten Lebendkontrolle wurden MTT-Assays durchgeführt. Hierzu wurden Zellen in einer 96-Well Platte ausgesät und nach 24 Stunden mit den zu testenden Substanzen behandelt. Die Bestimmung erfolgte als Triplikat. Nach Ablauf der 72 Stunden wurde die Tot-Kontrolle mit 5 µl Triton-X100 getötet und anschließend 10 µl MTT-Reagenz in jedes Well gegeben. Es wurde für 3 h im Inkubator inkubiert. Abschließend wurden 100 µl Stop-Solution in jedes Well gegeben um den entstandenen blauen Farbstoff aus den Zellen zu lösen. 24 Stunden nach Zugabe der Stop-Solution erfolgte die Absorptionmessung am SpectraMax ID5 Mikroplattenleser bei 595 nm.

6.15.1 Zytotoxizität der Vernetzer

Die Bestimmung der Toxizität der als Vernetzer eingesetzten Peptide und PEGDA erfolgte mit dem MTT-Assay. Hierzu wurden 1×10^4 HepG2/Well in je 100 μ l DMEM in einer 96-Well Platte ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte in den Kontrollen ein Mediumwechsel. In den übrigen Wells wurden die Zellen mit dem jeweiligen Vernetzer in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurde das Medium mit dem Vernetzer abgenommen, die Zellen einmal mit DPBS^{-/-} gewaschen und frisches Medium zugegeben. Anschließend wurde die Platte bis zum Erreichen einer Gesamtzeit von 72 Stunden weiter inkubiert, dann erfolgte die Bestimmung der Viabilität wie oben beschrieben. Für jedes Peptid wurden die Konzentrationen (10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M, 80 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1 mM, 3 mM, 5 mM und 10 mM) mit den Inkubationszeiten 10 min, 3h und 72 h untersucht.

6.15.2 Zytotoxizität der Aushärtungssysteme

Zur Bestimmung des Einflusses der eingesetzten Strahlungsquellen Omnicure S2000 zur Aushärtung der Hydrogele auf die Viabilität von HUVEC und NHDF wurden die Zellen mit der jeweiligen Strahlungsquelle bestrahlt und direkt nach der Bestrahlung und 24 Stunden danach ein MTT-Assay durchgeführt. Für den MTT-Assay wurden 1×10^4 Zellen/Well in je 100 μ l in einer 96-Well Platte mit weißen Wänden ausgesät und für 24 h inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel in allen Wells. Die Zellen wurden mit den festgelegten Bedingungen aus Tabelle 16 bestrahlt. Die Bestimmung der Viabilität erfolgte direkt nach der Bestrahlung (0Stunden) und nach 24 Stunden wie oben beschrieben als Triplikat. Es erfolgte kein Waschschrift und kein Mediumwechsel nach der Behandlung.

Tabelle 16: Bestrahlungsbedingungen zur Ermittlung der Toxizität des Omnicure S2000.

| | HUVEC | NHDF |
|----------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Abstand [cm] | 5 | 5 |
| Zeit [s] | 5, 15, 30 / 3, 5, 10 / 1, 3 | 5,15,20,30,60,90,180 |
| Intensität [mW/cm ²] | 500, 1500, 5000 | 500 |

6.15.3 Zytotoxizität von Abbauprodukten der Hydrogele

6.15.3.1 Ohne Zellen

Zur Bestimmung der Toxizität von Abbauprodukten der verwendeten Hydrogele durch im Medium enthaltenes FCS wurden Hydrogele wie oben beschrieben im 8-Well μ -slide (ibidi GmbH) hergestellt (200 μ l/Well) und nach dem Aushärten in je ein Well einer 24-Well Platte überführt. Es wurden je 700 μ l DMEM zugegeben und die Gele bei 37 °C inkubiert. Nach 3 Stunden, 24 Stunden, 3 Tagen, 7 Tagen, 14 Tagen und 21 Tagen wurden 600 μ L aus jedem Well entnommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 4 °C gelagert. Zusätzlich wurde an

den Tagen 9 und 16 ein Mediumwechsel nach gleicher Vorgehensweise durchgeführt. Es wurden nach jeder Entnahme je 600 µL frisches DMEM zugegeben und weiter inkubiert. Für die Bestimmung der Zytotoxizität der gesammelten Proben wurden $0,5 \times 10^4$ NHDF/Well in je 100 µl in einer 96-Well Platte ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte in den Kontrollen ein Mediumwechsel. Die Behandlung der Zellen erfolgte mit einer 1:10 Verdünnung der gesammelten Proben um etwaigen Viabilitätsverlusten durch zu wenig Medium vorzubeugen. Die Zellen wurden für 72 Stunden inkubiert, anschließend erfolgte der MTT-Assay wie oben beschrieben.

6.15.3.2 Mit Zellen

Zur Bestimmung der Toxizität von zellulären Abbauprodukten der verwendeten Hydrogele wurden zellbeladene Hydrogele mit $2,5 \times 10^6$ NHDF/ml im 8-Well µ-slide (ibidi GmbH) wie in Kapitel 6.17 beschrieben hergestellt (200 µl/Well). Die Gele wurden in je ein Well einer 24-Well Platte überführt und 700 µl DMEM zugegeben. Nach 3 Stunden, 24 Stunden, 3 Tagen, 7 Tagen, 14 Tagen und 21 Tagen wurden 600 µL aus jedem Well entnommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Es wurden 600 µl frisches DMEM in jedes Well gegeben und weiter inkubiert. Zusätzlich wurde an den Tagen 9 und 16 ein Mediumwechsel nach gleicher Vorgehensweise durchgeführt. Für den MTT-Assay wurden $0,5 \times 10^4$ NHDF/Well in je 100 µl in einer 96-Well Platte ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte in den Kontrollen ein Mediumwechsel, die Behandlung der Zellen erfolgte mit einer 1:10 Verdünnung der Proben um einem Viabilitätsverlust durch einen Mangel an frischem DMEM vorzubeugen. Die Zellen wurden nach der Behandlung für 72 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Viabilitätsbestimmung wie oben beschrieben.

6.16 Färbungen von Zellen

6.16.1 Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM und PI

Zur Darstellung der Viabilität von in Hydrogelen eingebetteten Zellen und darauf ausgesäten Zellen wurde die Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM und Propidiumiodid durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica TCS SPE/Leica Stellaris 5).

6.16.1.1 3D

Für die Darstellung der eingebetteten Zellen erfolgte die Lebend-Tot-Färbung für 25-30 min im Inkubator. Pro $0,2 \text{ cm}^3$ Gel in einem ibidi 8-Well µ-slide wurden 250 µl Färbelösung, bestehend aus 249 µl Zellkulturmedium, 1 µL Calcein-AM (1 mM) und 2,5 µl Propidiumiodid (2 mg/ml) eingesetzt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde einmal für 5 Min mit 200 µl DPBS^{-/-} gewaschen und das Gel anschließend mit 200 µl Zellkulturmedium überschichtet.

6.16.1.2 2,5D

Die Färbung der auf dem Hydrogel ausgesäten Zellen erfolgte analog zum Protokoll des Herstellers. Es wurden 200 µl Färbelösung (Kapitel 6.16.1.1) für 5 min auf den Gelen im Inkubator inkubiert und anschließend einmal mit DPBS^{-/-} gewaschen und das Gel mit 200 µl Zellkulturmedium überschichtet.

6.16.2 CellTracker™-Färbung des Cytosols

Die Färbung des Zytosols erfolgte mit CellTracker™. Die Zellen wurden in Suspension gebracht, zentrifugiert und das Pellet in der Färbelösung resuspendiert. Für die Färbelösung wird CellTracker™ (10 mM) 1:1000 im zellspezifischen Kultivierungsmedium verdünnt. Die Zellen wurden für 30 Min in der Färbelösung bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert, zwischendurch wurde die Suspension vorsichtig invertiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in DPBS^{-/-} resuspendiert. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde zweimal ausgeführt. Anschließend wurden die Zellen für weitere Versuche eingesetzt. Die Auswertung der CellTracker-Färbung erfolgte mit einem Konfokalmikroskop (Leica Stellaris 5).

6.16.3 HOECHST33342-Färbung der Zellkerne

Zur Färbung der Zellkerne mit HOECHST33342 wurden die zu färbenden Zellen in Suspension gebracht, zentrifugiert und in der Färbelösung (HOECHST33342 (10 mg/ml) 1:5000 in Zellkulturmedium) resuspendiert. Die Zellen wurden für 5-10 min im Inkubator inkubiert und erneut zentrifugiert. Es wurde zweimal mit DPBS^{-/-} gewaschen und die Zellen anschließend entsprechend des auszuführenden Versuches weiterverwendet.

6.17 Einbetten von Zellen in Hydrogele

6.17.1 2,5D Gele

Zum Aussäen von Zellen auf Hydrogeloberflächen wurden zunächst die Hydrogele, wie in Kapitel 6.9 beschrieben, unter sterilen Bedingungen hergestellt. Je 200 µl wurden in ein Well eines ibidi 8-Well µ-slides gegeben und mit dem Omnicure S2000 polymerisiert. Anschließend wurden die Zellen in Suspension gebracht und in einer Konzentration von 5x10⁴ Zellen/ml (HUVEC) beziehungsweise 2x10⁴ Zellen/ml (HepG2) in je 200 µl Zellkulturmedium auf den Hydrogelen ausgesät. Alle 48 Stunden wurde das Medium gewechselt. An den Tagen 1, 7, 14 und 21 wurde je eine Lebend-Tot-Färbung durchgeführt.

6.17.2 Zellebeladene Hydrogele ohne Vernetzer

Die Herstellung zellebeladener Hydrogele erfolgte analog zu den Gelen ohne Zellen, es wurde jedoch statt DPBS^{-/-} Zellsuspension verwendet. Der Photoinitiator wurde in einem Masse-zu-Volumen-Verhältnis von 10 % in sterilem DPBS^{-/-} gelöst.

6.17.2.1 GeIMA

Zunächst wurde GeIMA in sterilem DPBS^{-/-} bei 40 °C so gelöst, dass die Konzentration 10 % (w/v) betrug. Vor jeder Verwendung wurde der LAP auf 75 °C erhitzt, um ihn in Lösung zu bringen. Die Hydrogelstammlösung wurde vor ihrer Verwendung auf 40 °C erwärmt. Die einzubettenden Zellen wurden wie oben beschrieben trypsiniert und in Suspension gebracht. Die Zellzahl wurde bestimmt, die gewünschte Menge Zellen entnommen und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in dem benötigten Volumen Zellkulturmedium resuspendiert. Die genaue Zusammensetzung ist Tabelle 17 zu entnehmen, sie ist unabhängig vom Funktionalisierungsgrad.

Tabelle 17: Zusammensetzung von 1 ml zellbeladenem GeIMA.

| | Konzentration im Gel [%] | Volumen [μ l] |
|----------------|-----------------------------|-----------------------|
| GeIMA (10 %) | 5 | 500 |
| LAP (10 %) | 0,3 | 30 |
| Zellsuspension | | 470 |

Die Aushärtung erfolgte für 20 s mit Licht der Wellenlänge 320-500 nm und 500 mW/cm². Für Gele im 8-Well μ -slide wurden je Well 200 μ l Lösung verwendet, die nach dem Aushärten mit 200 μ l Medium überschichtet wurde. Die verwendete Zellzahl ist Tabelle 14 zu entnehmen. An Tag 1, 7, 14 und 21 wurde eine Lebend-Tot-färbung mit Calcein-AM und Propidiumiodid durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop.

6.17.2.2 GeINB/GeIS

Zur Herstellung der Stammlösungen wurde GeINB bei 40 °C und GeIS bei 60 °C in sterilem DPBS^{-/-} gelöst, sodass die Konzentrationen (w/v) für GeINB 10 % und für GeIS 5 % betragen. Die Stammlösungen wurden vor ihrer Verwendung auf 40 °C (GeINB) und 60 °C (GeIS) erwärmt. Die Zellen wurden, wie oben beschrieben, trypsiniert und in Suspension gebracht. Nach dem Bestimmen der Zellzahl wurde die gewünschte Menge Zellen entnommen und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in der benötigten Menge Zellkulturmedium resuspendiert (Tabelle 18) Alle Komponenten wurden in ihrer jeweils vorgesehenen Menge vereint.

Tabelle 18: Zusammensetzung von 1 ml zellbeladenem GelNB/GelS.

| | | Konzentration im Gel [%] | Volumen [μ l] |
|--------|--------------------|-----------------------------|-----------------------|
| Low | GelN Low (10 %) | 5 | 250 |
| | GelS Low (5 %) | 5 | 500 |
| | LAP (10 %) | 0,03 | 3 |
| | Zellsuspension | | 247 |
| Medium | GelN Medium (10 %) | 5 | 250 |
| | GelS Medium (5 %) | 5 | 500 |
| | LAP (10 %) | 0,03 | 3 |
| | Zellsuspension | | 247 |
| High | GelN High (10 %) | 5 | 172 |
| | GelS Medium (5 %) | 5 | 655 |
| | LAP (10 %) | 0,03 | 3 |
| | Zellsuspension | | 170 |

Für Gele im 8-Well μ -slide wurden je Well 200 μ l Lösung verwendet, die nach dem Aushärten mit 200 μ l Medium überschichtet wurde. Die Aushärtung erfolgte für 5 s mit dem Omnicure S2000 mit 500 mW/cm² (320-500 nm). Die verwendete Zellzahl ist Tabelle 21 zu entnehmen. An Tag 1, 7, 14 und 21 wurde eine Lebend-Tot-färbung mit Calcein-AM und Propidiumiodid durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop.

Tabelle 19: Verwendete Zellzahlen in den einzelnen Experimenten mit GelMA und GelNB/GelS.

| | Volumen/Gel [μ l] | Zellen/ml | Zellen/Gel |
|---------------------|---------------------------|----------------------|--------------------|
| Tox Abbauprodukte | 200 | $2,5 \times 10^6$ | $0,5 \times 10^6$ |
| Zellzahlen NHDF | 200 | $0,25 \times 10^6$ | 5×10^4 |
| | | $0,5 \times 10^6$ | 10×10^4 |
| | | $1,25 \times 10^6$ | 25×10^4 |
| Zellzahlen NHLF | 200 | $0,25 \times 10^6$ | 5×10^4 |
| | | $0,5 \times 10^6$ | 10×10^4 |
| | | $1,25 \times 10^6$ | 25×10^4 |
| | | $2,5 \times 10^6$ | 50×10^4 |
| PrestoBlue | 100 | $0,125 \times 10^6$ | $2,5 \times 10^4$ |
| | | $0,25 \times 10^6$ | 5×10^4 |
| | | $0,6125 \times 10^6$ | $12,5 \times 10^4$ |
| 3D Bioprinting NHDF | | $2,5 \times 10^6$ | - |

6.17.2.3 Hydrogele mit Vernetzer im μ -slide

Zur Einbettung von Zellen in Hydrogelen mit Vernetzer wurde analog vorgegangen, wie bei der Herstellung von Hydrogelen ohne Zellen. Zunächst wurde eine Stammlösung von GelS *Medium* in einer Konzentration von 6,95 % bei 60 °C in sterilem DPBS^{-/-} angesetzt. Die Vernetzer wurden bei Raumtemperatur in sterilem DPBS^{-/-} gelöst (Peptide 28 mM, PEGDA 250 mM). Die einzubettenden Zellen wurden in Suspension gebracht, die gewünschte Zellzahl entnommen, zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in der zum Ansetzen der Hydrogellösung benötigten Menge Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden alle benötigten Komponenten nach Tabelle 20 zusammengeführt. Je 200 μ l der Lösung wurden in ein Well eines 8-Well μ -slides gegeben und unter dem Omnicure polymerisiert. Anschließend wurden die Gele mit je 200 μ l Zellkulturmedium überschichtet. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 48 Stunden. War aufgrund des Quellens kein Mediumwechsel möglich, so wurde nur neues Zellkulturmedium zugegeben. An Tag 1, 7, 14 und 21 wurde eine Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM und Propidiumiodid durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop.

Tabelle 20: Zusammensetzung von 1 ml zellbeladener GelS/Peptoid Hydrogele.

| | | Konzentration im Gel [%] | Volumen [μ l] | Aushärtungs- zeit [s] | Intensität [mW/cm ²] |
|----------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| <i>GelS/P1</i> | GelS <i>Medium</i> (6,95 %) | 5 | 719 | 4 | |
| | P1 (28 mM) | 3,5 | 125 | | |
| | LAP (10 %) | 0,3 | 30 | | |
| | Zellsuspension | | 126 | | |
| <i>GelS/P2</i> | GelS <i>Medium</i> (6,95 %) | 5 | 719 | 9 | 1000 |
| | P2 (28 mM) | 3,5 | 125 | | |
| | LAP (10 %) | 0,03 | 3 | | |
| | Zellsuspension | | 153 | | |
| <i>GelS/P3</i> | GelS <i>Medium</i> (6,95 %) | 5 | 719 | 7 | |
| | P3 (28 mM) | 3,5 | 125 | | |
| | LAP (10 %) | 0,1 | 10 | | |
| | Zellsuspension | | 146 | | |

| | | | | |
|-------------------|--------------------|------|-----|----|
| <i>GeIS/P6</i> | <i>GeIS Medium</i> | 5 | 719 | 8 |
| | (6,95 %) | | | |
| | P6 | 3,5 | 125 | |
| | LAP (10 %) | 0,03 | 3 | |
| <i>GeIS/PEGDA</i> | Zellsuspension | | 153 | 30 |
| | <i>GeIS Medium</i> | 5 | 719 | |
| | (6,95 %) | | | |
| | PEGDA | 15 | 60 | |
| | (250 mM) | | | |
| LAP (10 %) | 0,3 | 30 | | |
| Zellsuspension | | 190 | | |

Tabelle 21: Verwendete Zellzahlen in den einzelnen Experimenten mit *GeIS/Vernetzer*.

| | Volumen/Gel [μ l] | Zellen/ml | Zellen/Gel |
|--------------------------|---------------------------|--------------------|---------------------|
| <i>ibidi</i> | 200 | $2,5 \times 10^6$ | $0,5 \times 10^6$ |
| <i>Tox Abbauprodukte</i> | 200 | $2,5 \times 10^6$ | $0,5 \times 10^6$ |
| <i>ibidi</i> | 200 | $2,5 \times 10^6$ | $0,5 \times 10^6$ |
| <i>12-Well Platte</i> | | | |
| <i>PrestoBlue</i> | 100 | $1,25 \times 10^6$ | $0,125 \times 10^6$ |

6.17.2.4 Zellbeladene Hydrogele mit Vernetzer in der 24-Well Platte

Die Herstellung der Hydrogele erfolgte wie die der Gele für die Kultivierung im *ibidi* slide (Kapitel 6.17.2.3). Nach der Aushärtung wurden die Gele vorsichtig mit einem Spatel aus ihrem Well entnommen und in eine mit 700 μ l/Well Zellkulturmedium befüllte 24-Well Platte überführt. Alle 48 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. War das auf Grund des Quellens nicht möglich, so wurde nur frisches Zellkulturmedium zugegeben. Für die Lebend-Tot-Färbung wurden die Gele zurück in ein Well eines 8-Well μ -slides transferiert, gefärbt und mikroskopiert (Tag 1, 7, 14 und 21).

6.18 PrestoBlue-Assay zur Quantifizierung der Proliferation

Um die Proliferation der in die Hydrogele eingebetteten Zellen zu quantifizieren wurde der PrestoBlue-Assay durchgeführt. In einer 96-Well Platte wurden je 100 μ l zellbeladenes Hydrogel/Well wie oben beschrieben (Kapitel 6.17) hergestellt (*GeIMA*, *GeINB/GeIS*, *GeIS/Vernetzer*). Es wurden verschiedene Zellzahlen NHDF in *GeIMA* und *GeINB/GeIS* eingebettet: $2,5 \times 10^4$, 5×10^4 und $12,5 \times 10^4$ pro 100 μ L Gel. In *GeIS/Vernetzer* wurden je $0,25 \times 10^6$ HepG2 oder NHDF pro 100 μ l Gel eingebettet. Die Gele wurden nach dem Aushärten

mit 100 µl DMEM überschichtet und bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Alle 48 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Hierzu wurde das vorhandene Zellkulturmedium vorsichtig abpipettiert und durch frisches DMEM ersetzt. Die Färbung erfolgte 30 min nach der Herstellung der Gele, an Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Für jeden Tag wurden zu den zellbeladenen Gelen Gele ohne Zellen hergestellt, die als Blank dienten. Hierfür wurde statt Zellsuspension DMEM verwendet. Vor jeder Färbung und jedem Mediumwechsel wurde die zu bearbeitende Platte für 30 Min auf Raumtemperatur gebracht, um den Gelen mehr Stabilität zu verleihen und so ein Zerstören zu verhindern. Für die Färbung wurde das Medium abpipettiert und alle Gele mit je 150 µl DPBS^{-/-} gewaschen. Die Färbung erfolgte mit 150 µl Färbelösung/Gel für 2 Stunden im Inkubator. Die Färbelösung bestand aus 9:1 DMEM:PrestoBlue-Reagenz. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Fluoreszenz mit dem SpectraMax ID5 Mikropplattenleser gemessen (Ex/Em: 560 nm/600 nm, Integration Time 400 ms, PMT Auto). Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten.

6.19 3D Biodruck

6.19.1 Festlegen des Referenzpunktes eines Druckkopfes am BioSpot BP

Vor Beginn eines Druckprozesses am BioSpot BP wurde der Referenzpunkt des Druckkopfes festgelegt. Hierzu wurde das zu bedruckende Substrat so positioniert, dass es sich mittig über dem auf dem Druckbett eingezeichneten Kreuz befand. Anschließend wurde der gewünschte Druckkopf ausgewählt und mit der Schaltfläche „move to substrate center“ in die Mitte des Druckbettes gefahren. Durch Hinzuziehen des Fadenkreuzes wurde die Kamera mittig über das zu bedruckende Substrat positioniert und die ermittelten Koordinaten mit „copy current coordinates“ in den Druckkopf übertragen und so als Referenz für X und Y gespeichert. Der Druckkopf wurde mit „move Dispenser to Alignment Position“ an die Referenzposition gefahren und die Z0-Höhe bestimmt. Hierzu wurde auf das zu bedruckende Substrat eine Kunststoffscheibe mit der Höhe 1,2 mm gelegt und der Druckkopf soweit nach unten bewegt, dass die Scheibe gerade so eingeklemmt wurde und sich nicht mehr bewegen ließ. Die Z-Höhe wurde notiert, der Druckkopf angehoben und die Scheibe entfernt. Der Druckkopf wurde zurück in die bestimmte Z-Höhe gebracht und von dort 1 mm nach unten bewegt. Die so bestimmte Z-Höhe wurde mit „Teach Z“ als Z0 festgelegt und der Druckkopf in die Ausgangsposition zurückgefahren. Die verwendeten G-Codes wurden so erstellt, dass der Referenzpunkt des Druckers jeweils die Mitte der zu druckenden Struktur darstellte, im Code wurden absolute Koordinaten verwendet.

6.19.2 Bestimmung geeigneter Druckparameter für die Photopolymerlösungen

6.19.2.1 Drucktemperatur

Zur Bestimmung der optimalen Drucktemperatur der Hydrogele für den Extrusionsdruck mit dem BioSpot BP wurden zunächst 5 %ige Hydrogelvorläuferlösungen mit der entsprechenden

Menge Photoinitiator angesetzt (siehe Kapitel 6.9). Die Lösungen wurden in 3 ml Inkjet Einwegspritzen mit Luer-Lock Anschluss überführt, die Spritze mit einem Kombistopfen LL verschlossen und die Spritze mit dem Stopfen nach oben bei Raumtemperatur für 30 min gelagert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Spritze in den Extrusionsdruckkopf des Bioprinters eingesetzt und für 30 min auf die gewünschte Temperatur gebracht (Temperatur der Kühlflüssigkeit $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nach 30 min wurde der Stopfen abgenommen, die Kerntemperatur der Tinte überprüft und bei Bedarf die Temperierung um weitere 30 min verlängert. Nach Erreichen der gewünschten Temperatur (Tabelle 22) wurde eine konische Dosiernadel (150 μm , 250 μm oder 410 μm) angebracht. Mit jeder Nadel wurde ein Gitter gedruckt, die Extrusionsrate E [mm/s] wurde dabei so gewählt, dass ein kontinuierliches Filament aus der Nadel extrudiert wurde, hierbei wurde zunächst nicht auf eine möglichst schmale Linienbreite geachtet. Eine Temperatur wurde als geeignet bezeichnet, wenn die Gitterstruktur in zwei Schichten eindeutig als eine solche erkennbar war und die Tinte eine homogene Struktur aufwies. Die Ergebnisse wurden fotografisch dokumentiert.

Tabelle 22: Bestimmung der optimalen Drucktemperatur für die verschiedenen Photopolymerlösungen. Die optimale Temperatur ist fett dargestellt.

| | | ID [μm] | T [$^{\circ}\text{C}$] |
|---------------------|---------------|------------------------|----------------------------|
| <i>Ge/MA</i> | 1.0 | 150 | 15, 17, 20, 24 , 27 |
| | | 250 | 15, 17, 20, 23 , 25 |
| | | 410 | 15, 17, 20, 23, 25 |
| | 8.0 | 150 | 15, 17, 18 , 23, 25 |
| | | 250 | 15, 17, 20, 23 , 25 |
| | | 410 | 15, 17, 20, 23, 25 |
| | <i>High</i> | 150 | 15, 19, 21 , 24, 27 |
| | | 250 | 15, 17, 21 , 23, 25 |
| | | 410 | 15, 17, 20 , 23, 25 |
| | <i>Low</i> | 150 | 15, 17, 21 , 23, 26 |
| | | 250 | 15, 17, 20 , 23, 26 |
| | | 410 | 15, 17, 22 , 23, 26 |
| <i>Ge/INB/Ge/IS</i> | <i>Medium</i> | 150 | 15, 17, 20 , 22, 25 |
| | | 250 | 15, 17, 21, 22 , 25 |
| | | 410 | 15, 17, 20 , 22, 26 |
| | <i>High</i> | 150 | 15, 17, 21 , 23, 26 |
| | | 250 | 15, 17, 19 , 22, 26 |
| | | 410 | 15, 17, 20, 21 , 27 |

6.19.2.2 Extrusionsgeschwindigkeit

Zur Bestimmung der optimalen Fahrgeschwindigkeit F [mm/s] und der kleinsten möglichen Extrusionsgeschwindigkeit E [mm/s] bei der ermittelten Drucktemperatur wurde zunächst der Fahrgeschwindigkeitsbereich bestimmt, bei der das Filament auch bei sehr niedrigen Extrusionsgeschwindigkeiten nicht abreißt. In einem zweiten Schritt wurde die kleinste Extrusionsgeschwindigkeit bestimmt, mit der eine fehlerlose Gitterstruktur erhalten wurde. Bei konstanter Achsengeschwindigkeit wurde die Extrusionsgeschwindigkeit ausgehend von 0,075 mm/s reduziert, bis keine fehlerlose Struktur mehr erhalten wurde. Die Tintenvorbereitung und Temperierung erfolgten wie oben beschrieben. In Tabelle 18 sind die Druckparameter dargestellt, welche bestimmt wurden.

Tabelle 23: Bestimmung der optimalen Achsengeschwindigkeit F und der kleinsten möglichen Extrusionsgeschwindigkeit E für die verschiedenen Photopolymerlösungen. Die optimalen Parameter sind in fett dargestellt.

| | | ID [μm] | T [$^{\circ}\text{C}$] | F [mm/s] | $E_{\text{ermittelt}}$ [mm/s] |
|------------|--------|----------------------|--------------------------|--------------------|--|
| GelMA | 1.0 | 150 | 24 | | 0,05, 0,025 , 0,02, 0,015, 0,01 |
| | | 250 | 23 | | 0,05, 0,025, 0,02, 0,015 , 0,01 |
| | | 410 | 25 | | 0,05, 0,025, 0,02 , 0,015, 0,01 |
| | 8.0 | 150 | 18 | 8, 10 , 12, | 0,05, 0,025, 0,02 , 0,015, 0,01 |
| | | 250 | 23 | 14 | 0,05, 0,025, 0,02 , 0,015, 0,01 |
| | | 410 | 25 | | 0,05, 0,025, 0,02, 0,015 , 0,01 |
| | High | 150 | 21 | | 0,05, 0,025, 0,02, 0,015 , 0,01 |
| | | 250 | 21 | | 0,05, 0,025 , 0,02, 0,015, 0,01 |
| | | 410 | 20 | | 0,05, 0,025, 0,02 , 0,015, 0,01 |
| | Low | 150 | 20 | | 0,05, 0,025, 0,02 , 0,015, 0,01 |
| | | 250 | 21 | | 0,05, 0,025, 0,02, 0,015 , 0,01 |
| | | 410 | 22 | | 0,05, 0,025 , 0,02, 0,015, 0,01 |
| GelNB/GelS | Medium | 150 | 20 | 8, 10 , 12, | 0,05, 0,025, 0,02 , 0,015, 0,01 |
| | | 250 | 22 | 14 | 0,05, 0,025, 0,02, 0,015 , 0,01 |
| | | 410 | 20 | | 0,05, 0,025 , 0,02, 0,015, 0,01 |
| | High | 150 | 21 | | 0,05, 0,025, 0,02 , 0,015, 0,01 |
| | | 250 | 19 | | 0,05, 0,025, 0,02, 0,015 , 0,01 |
| | | 410 | 21 | | 0,05, 0,025 , 0,02, 0,015, 0,01 |

6.19.3 Extrusionsdruck von Gitterstrukturen mit zellbeladenen Hydrogelen

Für das Drucken mit zellbeladenen Hydrogelen wurden Photopolymerlösungen mit Zellen wie in Kapitel 6.17 hergestellt. Als Zellsuspension wurden $2,5 \times 10^6$ NHDF/ml in DMEM eingesetzt. Die Lösung wurde noch warm in eine 2 ml Spritze überführt, die Spritze mit einem Kombistopfen verschlossen und über Kopf für 30 min bei Raumtemperatur oder für 10 min bei 4°C gelagert. Anschließend wurde die Spritze in den bereits referenzierten Extrusionsdruckkopf des BioSpot BP eingesetzt und auf die in Tabelle 17 für die jeweilige

Photopolymerlösung angegebene Temperatur gebracht. Die Temperierung erfolgte für 60 min. Danach wurde der Stopfen durch eine Dosiernadel mit dem Durchmesser 250 µm ersetzt und durch eine kurze Extrusion überprüft, ob die Konsistenz geeignet für den Druckvorgang ist. Bei geeigneter Konsistenz wurde der gewünschte G-Code gestartet und die Struktur schichtweise aufgebaut. Die Aushärtung erfolgte schichtweise mit dem Omnicure S2000 mit 500 mW/cm² (320-500 nm) für GelMA für 20 s und für GelNB/GelS für 5 s. Es wurden Gitter mit der Kantenlänge 12 mm gedruckt.

Die Anzahl der Schichten variierte zwischen zwei und sechs Schichten. Für jedes Experiment wurde die Achsengeschwindigkeit F und die Extrusionsgeschwindigkeit E im ermittelten Bereich (Tabelle 23) eingestellt. Die ausgehärteten, gedruckten Strukturen wurden einmal mit DPBS^{-/-} gewaschen und anschließend in einer Petrischale mit DMEM überschichtet. Die Kultivierung erfolgte im Inkubator für 14 Tage. An T0, T7 und T14 wurde eine Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM und Propidiumiodid durchgeführt. Hierzu wurde das Medium abgenommen und 500 µl Färbelösung auf die Struktur gegeben (Kapitel 6.16.1). Die Inkubation erfolgte für 15-20 min bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Struktur einmal mit DPBS^{-/-} gewaschen, der Objektträger aus der Petrischale entnommen und die Flüssigkeit sorgfältig mit einem Tuch entfernt. Die Auswertung erfolgte mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie.

6.19.4 Aufbau eines BBB-Modells auf einem PC-Substrat

Zum Aufbau eines Blut-Hirn-Schranke-Modells auf dem PC-Substrat *vasQchip* wurden HBVP, HA und HN in GelMA8.0 und GelNB/GelS *Medium* verwendet. Das Modell wurde schichtweise aufgebaut, die den Kanal umgebende Schicht bestand aus HBVP-enthaltender Biotinte, die äußere Schicht aus HA/HN-enthaltender Biotinte. Die Drucktemperatur ist Tabelle 22 zu entnehmen. Die Extrusion erfolgte durch eine konische Dosiernadel mit einem Innendurchmesser von 250 µm.

6.19.4.1 Darstellung der korrekten Positionierung

Zur Darstellung der korrekten Positionierung der Zellen auf dem Chip wurden Perizyten, Astrozyten und NHDF (exemplarisch statt HN) verwendet. Die Zellen wurden zunächst trypsinisiert, die Zellzahl bestimmt und wie in Kapitel 6.16.2 beschrieben mit CellTracker™ green (HBVP) und CellTracker™ red (HA) und HOECHST33342 (NHDF) im jeweiligen Zellkulturmedium gefärbt. Anschließend wurden die Biotinten wie in Tabelle 17 und Tabelle 18 gezeigt hergestellt, die eingesetzten Zellkonzentrationen betragen für die HBVP 2,5x10⁶ Zellen/ml, für die HA 1,875x10⁶ Zellen/ml und für die NHDF 0,625x10⁶ Zellen/ml. Die Tinte wurde je in eine 3 ml Inkjet Einwegspritzen mit Luer-Lock Anschluss überführt, mit einem Kartuschendeckel verschlossen und bis zu Verwendung bei RT gelagert. Anschließend wurde die Tinte mit den HBVP zur Temperierung in den Extrusionsdruckkopf eingesetzt und für 30

min auf die jeweilige Drucktemperatur gebracht (Tabelle 22). Die für den Druckvorgang verwendete konische Dosiernadel wurde aufgesetzt und die Referenzposition festgelegt. Anschließend wurde der Druckvorgang für den Druck der Perizyten gestartet. Die gedruckte Struktur wurde mit dem Omnicure S2000 ausgehärtet und die Spritze im Druckkopf gewechselt, sodass die zweite Schicht, bestehend aus HA und NHDF, auf die erste Schicht gedruckt werden konnte. Nach dem Aushärten der zweiten Schicht, wurde der Chip vom Druckbett entnommen und mit einem Deckglas verschlossen. Das Kompartiment wurde mit KM gefüllt und der Chip bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie wurde die korrekte Positionierung der einzelnen Schichten und Zellen dargestellt (Leica Stellaris 5).

6.19.4.2 Aufbau des BBB-Modells mit HN

Der Aufbau des Modells erfolgte schichtweise. Jede Schicht wurde für 24 Stunden mit Medium überschichtet inkubiert, um den Zellen eine Anpassung zu ermöglichen. An Tag 0 wurden die HBVP in Suspension gebracht und die Zellzahl bestimmt. Die Biotinten wurden wie in Tabelle 12 und Tabelle 13 in KM hergestellt, sodass die Zellkonzentration 2,5x10⁶ HBVP/mL betrug. Die Tinte wurde in eine Spritze überführt, verschlossen und bis zur Verwendung bei RT gelagert. Für den Druckvorgang wurde die Spritze in den Extrusionsdruckkopf eingesetzt, für 30 Minuten auf die jeweilige Drucktemperatur (Tabelle 18) gebracht. Nach dem Aufsetzen der Dosiernadeln und Festlegen der Referenzposition wurde der Druckvorgang für die erste Schicht gestartet. Anschließend wurde die Struktur ausgehärtet und mit KM/NM 1:1 überschichtet. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Inkubator.

An Tag 1 wurden die HN aus der Lagerung bei -196 °C entnommen, aufgetaut, in Neuronenmedium (NM) getropft und die Zellzahl bestimmt. Die gewünschte Zellzahl von 0,625x10⁶ HN wurde entnommen und nach dem Zentrifugieren (1200 rpm, 5 Min, Eppendorf Centrifuge 5810R, Rotor A-4-81) in 940 µL KM/NM 1:1 resuspendiert. Die HA wurden trypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Die gewünschte Zellzahl wurde entnommen, sodass in der Biotinte 1,875x10⁶ HA/mL vorlagen. Die Biotinten wurden wie in Tabelle 17 und Tabelle 18 beschrieben mit KM:NM 1:1 hergestellt und in eine 3 ml Inkjet Einwegspritzen mit Luer-Lock Anschluss überführt. Die verschlossenen Spritzen wurden bis zur Verwendung bei RT gelagert. Die Tinte wurde für 30 Minuten im Druckkopf temperiert, anschließend wurde das Medium vom schon bedruckten Chip abgenommen und die Oberfläche für 5 Minuten trocknen gelassen. Zum Bedrucken der ersten Schicht wurde erneut der Referenzpunkt festgelegt und die zweite Schicht aufgedruckt. Nach der Aushärtung wurde der Chip aus dem Druckbett entnommen und für 60 Minuten mit KM/NM 1:1 überschichtet im Inkubator äquilibriert. Anschließend wurde der Chip vorsichtig mit einem Deckglas verschlossen.

An Tag 2 wurde der Mikrokanal (LxBxH 20x1x0,3 mm³) mit 50 µl einer Beschichtungslösung (Kollagen I, 1 mg/ml) für 60 min im Inkubator beschichtet, anschließend erfolgte die Besiedlung

des Mikrokanals mit hCMEC/D3. Hierzu wurden die Endothelzellen trypsinisiert, die Zellzahl bestimmt und die Zellen in einer Konzentration von $37,5 \times 10^5$ Zellen/ml in Suspension gebracht. 20 μ l der Lösung wurden in den Mikrokanal pipettiert und der Chip für 60 min bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit mit einer Geschwindigkeit von 4 U/Stunde gedreht. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Chip in eine aufrechte Position gebracht, die Anschlüsse mit Medium befüllt und für 60 min statisch inkubiert. Anschließend wurde der Kanal mit KM/NM 1:1 gespült und an die Mikrofluidik angeschlossen. Vor dem Anschluss wurden alle benötigten Schläuche und Spritzen bereits am Vortag mit KM/NM 1:1 befüllt und bis zur Verwendung im Inkubator gelagert. Vor dem Anschließen wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen im System befanden. Die Schläuche wurden mit den Anschlüssen des Kanals verbunden, für 60 min statisch inkubiert und anschließend die Fluidik gestartet. Die Flussrate von 100 μ l/Stunde wurde von der Spritzenpumpe Fusion 200 (Chemyx) mit der Infusionmethode erzeugt. Der Auslass des Kanals war mit einem Schlauch verbunden, welcher in ein Abfallgefäß führte. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel.

An Tag 3 und 7 wurde eine Lebend-Tot-Färbung der Zellen im Gel und eine Hoechst33342 Färbung der Zellen im Kanal durchgeführt. Hierzu wurde die Färbelösung mit Calcein-AM und PI wie in Kapitel 6.16.1 beschrieben angesetzt, in das Kompartiment pipettiert und für 25 min im Inkubator inkubiert. Die Färbung des Kanals erfolgte mit 150 μ l HOECHST33342 für 5 min. Die Färbung wurde mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie aufgezeichnet (Leica Stellaris 5).

6.19.5 Kanalstrukturen aus Hydrogelen ohne Vernetzer

6.19.5.1 Einfache Kanalstrukturen ohne Perfusionsmöglichkeit

Zum Aufbau von Kanalstrukturen aus Hydrogel wurde Gelatinelösung (5 % w/v) als Opferstruktur genutzt. Für das Fundament und den Deckel der Struktur wurden die Hydrogele GelMA und GeINB/GelS verwendet. Die Tinte wurde wie in Tabelle 7 und Tabelle 8 hergestellt, warm in eine 3 ml Spritze überführt und die Spritze verschlossen für 30 Min über Kopf bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurde die Tinte in den Extrusionsdruckkopf des BioSpot BP eingesetzt und auf die jeweilige optimale Drucktemperatur gebracht (60 min). Der schematische Aufbau der Kanalstruktur ist in Abbildung 3 gezeigt. Zunächst wurde mit der Photopolymerlösung ein zweischichtiges Fundament gedruckt, welches schichtweise mit dem Omnicure S2000 (500 mW/cm², 20 s GelMA, 5 s GeINB/GelS) ausgehärtet wurde. Anschließend wurde die Opferstruktur auf das Fundament gedruckt. Ungeachtet der Umrandung, wurde ein Deckel über den Kanal pipettiert. Der Deckel wurde schichtweise ausgehärtet (500 mW/cm², 320 500 nm) und der Objektträger in eine Petrischale überführt. Die Struktur wurde mit wenig DPBS⁻ überschichtet und bei 40 °C für 60 min inkubiert. Nach Ablauf der 60 min wurde die Struktur an den Enden des Kanals mit einer Rasierklinge aufgeschnitten und die Gelatinelösung mit einer gelben Pipettenspitze vorsichtig entfernt. Zur Darstellung des erhaltenen Hohlraumes wurde dieser mit einer Methylenblaulösung gefüllt.

6.19.5.2 Einfache Kanalstrukturen ohne Perfusionsmöglichkeit mit HUVEC

Der Aufbau von Kanalstrukturen aus Hydrogelen mit Endothelzellen, erfolgte analog zum Aufbau der Kanäle ohne Zellen (Abbildung 4). Es wurde jedoch Gelatinelösung verwendet, welche HUVEC enthielt. Die Photopolymerlösungen enthielten keine Zellen. Der Deckel wurde gedruckt.

Für die Opferstruktur wurde Gelatine 5 % (w/v) in EGM-2 bei 40°C gelöst und anschließend mit Zellsuspension verdünnt, sodass die Gelatinekonzentration 2,5 % betrug und 1×10^6 HUVEC/ml enthalten waren. Die Spritze wurde bis zur Verwendung über Kopf bei Raumtemperatur gelagert. Die Vorbereitung der Photopolymerlösungen erfolgte nach Tabelle 17 und Tabelle 18 unter sterilen Bedingungen. Die Spritze wurde über Kopf für 30 min bei Raumtemperatur gelagert und dann zur Temperierung in den Extruder eingesetzt. Nach Erreichen der Drucktemperatur (60 min) wurde ein zweischichtiges Fundament gedruckt und schichtweise ausgehärtet (500 mW/cm^2 , 320-500 nm). Die Gelatine wurde in den Extruder eingesetzt und temperiert (60 min). Bei Erreichen der Drucktemperatur wurde Z0 neu referenziert (auf die Oberfläche des Fundamentes) und der Druckvorgang gestartet. Anschließend wurde erneut die Photopolymerlösung in den Extruder eingesetzt, temperiert und der Kanal mit einem Deckel von oben verschlossen. Nach Aushärtung des Deckels wurde der Objektträger mit der Struktur mit einem Kunststoffdeckel und Parafilm verschlossen um ein Austrocknen der Struktur zu verhindern. Der Objektträger wurde in eine selbstkonstruierte Drehvorrichtung (basierend auf Wantai Nema 17 Schrittmotor 40mm 1.7A) eingespannt (Abbildung 101) und für 2 Stunden im Inkubator mit 40 U/Stunde um die Längsachse des Kanals gedreht, um ein gleichmäßiges Anwachsen der HUVEC an den Wänden zu ermöglichen.

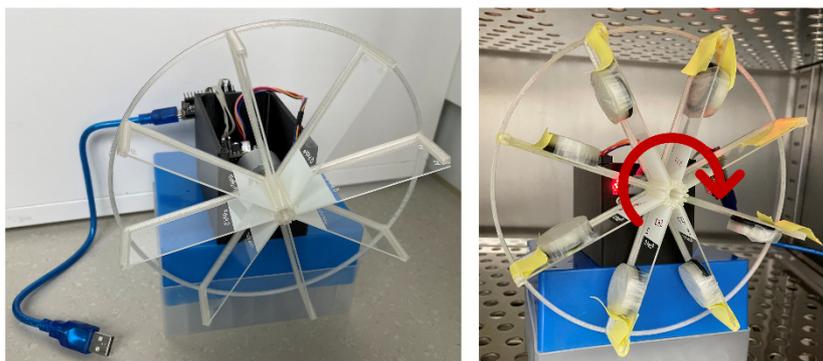


Abbildung 101: Gerät zur Besiedelung des Kanals mit HUVEC. Im Inkubator wurden die gedruckten Strukturen für 2 Stunden um die Längsachse des Kanals gedreht um die HUVEC an die Kanalwände zu bringen und die Opferstruktur gleichmäßig aufzulösen.

Nach 2 Stunden wurden die Objektträger aus der Apparatur genommen, in eine Petrischale überführt und mit EGM-2 überschichtet. Nach 24 Stunden erfolgte eine Lebend-Tot-Färbung mit fluoreszenzmikroskopischer Auswertung (Leica Stellaris 5, 10x Objektiv, 0,75 Zoom, Z-Stack Höhe 300 μm , Schrittgröße 5 μm , Ex. 494 nm, Em. 499-544 nm; Ex. 549 nm, Em. 202

591-725 nm) zur Visualisierung der angewachsenen HUVEC. Um die Kanalstruktur direkt nach dem Druckvorgang zu visualisieren wurden zusätzlich Kanäle aus Hydrogelen und zellbeladener Gelatine aufgebaut, welche mit CellTracker™ green (Kapitel 6.16.2) gefärbte HUVEC enthielt. Die Auswertung erfolgte direkt nach dem Druckvorgang ohne Inkubationszeit fluoreszenzmikroskopisch (Leica Stellaris 5).

6.19.5.3 **Aufbau von perfundierbaren Kanalstrukturen im MX-System**

6.19.5.3.1 **Strukturen mit NHDF und HUVEC**

Zur Versorgung der Zellen in den gedruckten Kanalstrukturen wurden die Kanalstrukturen in eine Vorrichtung (Anhang 9.2.3) (Abbildung 71) gedruckt, die es ermöglichte, den Kanal durch Dosiernadeln zu durchspülen. Hierzu wurde zunächst ein Deckglas (20x54 mm²) in einer Halterung auf dem Druckbett fixiert und das Fundament der Struktur aus GelMA oder GelNB/GelS auf das Deckglas gedruckt (4 Schichten) und schichtweise ausgehärtet. Anschließend wurde das Deckglas aus dem Druckbett entnommen und die Vorrichtung auf das Deckglas geklebt. Die Vorrichtung wurde zurück in die Halterung auf das Druckbett gebracht und der Druck der Struktur mit den Seiten des Kanals fortgesetzt. Die Aushärtung erfolgte schichtweise. Der Druck der Opferstruktur erfolgte mit 5 % Gelatine (ohne Zellen) oder 2,5 % (mit Zellen). Abschließend wurde der Kanal mit einem Deckel aus Hydrogel verschlossen. Die Aushärtung des Deckels erfolgte schichtweise. Nach Aushärtung der letzten Schicht wurde die Vorrichtung mit einem Deckglas verschlossen und mit 2 ml DPBS^{-/-} oder Zellkulturmedium befüllt. Für den Aufbau von Strukturen mit Zellen, wurden Biotinten verwendet, in welchen die Zellen suspendiert waren. Hierzu wurden HUVEC und NHDF in Suspension gebracht und die Zellzahl bestimmt. Die HUVEC wurden in einer Konzentration von $1,25 \times 10^6$ Zellen/ml in 2,5 % Gelatine resuspendiert, die NHDF in einer Konzentration von $0,625 \times 10^6$ Zellen/ml in GelMA *High* und GelNB/GelS *High*. Das Verhältnis von HUVEC zu NHDF betrug in der gedruckten Struktur 2:1. Der Druckvorgang erfolgte wie oben beschrieben. Die gedruckten Strukturen wurden für 2 Stunden bei 37 °C mit 40 U/Stunde um die Längsachse des Kanals gedreht, um eine gleichmäßige Verteilung der HUVEC über die Kanaloberfläche zu gewährleisten. Nach 2 Stunden wurden die Vorrichtungen aus der Drehung entnommen und im Inkubator über Nacht statisch inkubiert. Nach dem Herauslösen der Opferstruktur wurde der Kanal mit EGM-2 gefüllt und die Strukturen weiter inkubiert. An Tag 1 und 7 erfolgte eine Lebend-Tot-Färbung der Zellen im Gel wie in Kapitel 6.16.1 beschrieben. Die Auswertung erfolgte mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5, 10x Objektiv, 0,75 Zoom, Z-Stack Höhe 300 µm, Schrittgröße 5 µm, Ex. 494 nm, Em. 499-544 nm; Ex. 549 nm, Em. 591-725 nm). Zusätzlich wurden Strukturen mit CellTracker™ gefärbten HUVEC und NHDF gedruckt, um die Positionierung zu visualisieren. Die Kultivierung der zellenthaltenden Strukturen erfolgte statisch.

6.19.5.4 Perfundierte Kanalstrukturen ohne Zellen

Der Druckvorgang erfolgte wie oben beschrieben. In der Struktur waren keine Zellen enthalten. Um zu zeigen, dass der Kanal durchgängig ist und mit einer Pumpe perfundiert werden kann, wurde die Opferstruktur nach 3 Stunden Inkubation bei 37 °C entfernt und die Vorrichtung an eine selbstkonstruierte Peristaltikpumpe mit Getriebe (Wantai Nema 17 Schrittmotor 40mm 1.7A, 150 U/min, Übersetzung 25:1) angeschlossen, welche eine Methylenblaulösung durch die Struktur pumpte. Die Flussgeschwindigkeit betrug 562 µl/min.

6.19.5.4.1 Beobachtung der Diffusion aus dem Kanal in das Hydrogel

Zur qualitativen Einordnung, wie lange es dauert, bis sich kleine Moleküle aus dem Kanal heraus in der gesamten Struktur verteilen, wurde der Kanal mit einer Methylenblaulösung gefüllt und die Verteilung der Farbe zu verschiedenen Zeitpunkten fotografisch dokumentiert.

6.20 Direct Laser Writing

6.20.1 Zusammensetzung der Photopolymerlösung

Um zu bestimmen, welche Menge Photoinitiator für das DLW mit GelNB/GelS *High* mindestens nötig ist, wurden Photopolymerlösungen wie in Kapitel 6.9.1.2 hergestellt und mit unterschiedlichen Mengen LAP (1,7 %, 1,3 %, 1,0 %, 0,5 %, 0,3 %) versetzt. Für den Schreibvorgang wurden je 50 µl der Lösung auf ein silanisiertes Deckglas gegeben und in den Probenhalter des Photonic Professional GT (nanoscribe GmbH) eingesetzt. Für alle Proben wurde ein Dosis-Test und ein Block-Power Test (variable Schreibgeschwindigkeit und Laserintensität), sowie hohle Quader geschrieben. Die Strukturen wurden zur Entwicklung für 20 min bei 40 °C in DPBS^{-/-} gelegt. Durch Hellfeldmikroskopie wurde die Form der Struktur beurteilt.

6.20.2 Schreiben von zellenthaltenden Strukturen

Für das Schreiben von zellenthaltenden Strukturen wurde die Photopolymerlösung GelNB/GelS *High* mit 1 % LAP angesetzt. Vor jedem Schreibvorgang wurden 1×10^6 HepG2/ml zugegeben und 50 µl der Lösung auf einem silanisierten Deckglas in den Probenhalter eingesetzt. Um die Strukturen zu visualisieren wurde der Photopolymerlösung außerdem der Farbstoff ATTO647N zugesetzt. Der Schreibvorgang erfolgte mit einer Schreibgeschwindigkeit von 10000 µm/s und einer Laserleistung von 80%. Zusätzlich zu den geschriebenen Strukturen wurde GelNB/GelS *High* (5 % Gel, 1 % LAP, 200 µl) mit 5×10^6 HepG2/ml hergestellt und die Viabilität mit einer Lebend-Tot-Färbung beurteilt, um die Biokompatibilität der Photopolymerlösung zu analysieren. Die geschriebenen Strukturen wurden ebenfalls mit Calcein-AM und PI gefärbt.

7 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| % | Prozent |
| °C | Grad Celsius |
| μ | Mikro |
| μg | Mikrogramm |
| μm | Mikrometer |
| 2D | Zweidimensional |
| 3D | Dreidimensional |
| Äq. | Äquivalent |
| BBB | Blut-Hirn-Schranke (engl.: <i>blood brain barrier</i>) |
| c | Konzentration |
| Cm | Zentimeter |
| cm ² | Quadratzentimeter |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| D ₂ O | Deuterium Oxid, deuteriertes Wasser |
| Da | Dalton |
| DCM | Dichlormethan |
| ddH ₂ O | Destilliertes Wasser |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i>) |
| DPBS ⁻ | <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> |
| E | Extrusionsgeschwindigkeit |
| ECM | Extrazelluläre Matrix (engl.: <i>extracellular matrix</i>) |
| EDC·HCl | 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGM-2 | <i>Endothelial Cell Growth Medium-2</i> |
| Em | Emmision |
| Ex | Anregung (engl.: <i>excitation</i>) |
| F | Achsen­geschwindigkeit |
| FCS | Fetales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i>) |
| g | Gramm |
| G' | Speichermodul |
| G'' | Verlustmodul |
| GeIMA | Gelatinemethacryloyl |
| GeINB | Norborenen-funktionalisierte Gelatine |

| | |
|------------------------|--|
| GeIS | Thiolierte Gelatine |
| Gly | Glycin |
| H₂O | Wasser |
| HA | Humane Astrozyten |
| HBVP | Humane cerebrale vaskuläre Perizyten (engl.: <i>human brain vascular pericytes</i>) |
| HCl | Salzsäure |
| Hcmec/D3 | Humane cerebrale Endothelzellen |
| HepG2 | Leberkrebszellen (engl.: <i>liver hepatocellular carcinoma</i>) |
| HPro | Hydroxyprolin |
| HUVEC | Humane Nabelschnurendothelzellen (engl.: <i>human umbilical vein endothelial cells</i>) |
| ID | Innendurchmesser |
| IFG | Institut für funktionelle Grenzflächen |
| Hyl | L-Hydroxylysin |
| Hz | Hertz |
| K | Kelvin |
| kDa | Kilodalton |
| KIT | Karlsruher Institut für Technologie |
| L | Liter |
| LAP | Lithiumphenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat |
| LB | Nährmedium für Bakterien (engl.: <i>lysogeny broth</i>) |
| LD₅₀ | Letale Dosis 50 |
| Lys | L-Lysin |
| M | Molar, mol/L |
| m | Multipllett |
| MAA | Methacrylsäureanhydrid |
| m_{dry} | Trockengewicht/Polymergewicht |
| MES | Morpholinoethansulfonsäure |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| MMP | Matrix-Metalloprotease |
| mM | Millimolar, mmol/l |
| mmol | Millimol |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromid |

| | |
|-------------------------------------|---|
| mW | Milliwatt |
| m_{wet} | Nassgewicht |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| Na₂SO₄ | Natriumsulfat |
| NCA | 5-Norbornen-2-carbonsäure |
| NHDF | Normale humane Hautfibroblasten (engl.: <i>normal dermal human fibroblast</i>) |
| NHS | <i>N</i> -Hydroxysuccinimid |
| nm | Nanometer |
| NMR | Kernspinresonanz (engl.: <i>nuclear magnetic resonance</i>) |
| PC | Polycarbonat |
| PEGDA | Polyethylenglykoldiacrylat |
| PI | Propidiumiodid |
| ppm | Parts per million |
| Pro | Prolin |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i>) |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| THF | Tetrahydrofuran |
| TNBSA | Trinitrobenzolsulfonsäure (engl.: <i>trinitrobenzene sulfonic acid</i>) |
| ü.N. | Über Nacht |
| UV | Ultraviolett |
| δ | Delta, chemische Verschiebung |
| λ | Lambda, Wellenlänge |

8 Literatur

1. Donderwinkel, I., van Hest, J.C.M. & Cameron, N.R. Bio-inks for 3D bioprinting: recent advances and future prospects. *Polymer Chemistry* **8**, 4451-4471 (2017).
2. Park, S.-H., Jung, C.S. & Min, B.-H. Advances in three-dimensional bioprinting for hard tissue engineering. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **13**, 622-635 (2016).
3. Macchiarini, P. et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* **372**, 2023-30 (2008).
4. Geckil, H., Xu, F., Zhang, X., Moon, S. & Demirci, U. Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Nanomedicine (Lond)* **5**, 469-84 (2010).
5. Skalak, R. & Fox, C.F. Tissue engineering : proceedings of a workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26-29, 1988. (1988).
6. Malda, J. et al. 25th Anniversary Article: Engineering Hydrogels for Biofabrication. *Advanced Materials* **25**, 5011-5028 (2013).
7. Petersen, O.W., Rønnov-Jessen, L., Howlett, A.R. & Bissell, M.J. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 9064-9068 (1992).
8. Teti, A. Regulation of cellular functions by extracellular matrix. *J Am Soc Nephrol* **2**, S83-7 (1992).
9. Bissell, M.J., Rizki, A. & Mian, I.S. Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 753-62 (2003).
10. Yue, B. Biology of the extracellular matrix: an overview. *Journal of glaucoma* **23**, S20-S23 (2014).
11. Baker, E.L., Bonnecaze, R.T. & Zaman, M.H. Extracellular matrix stiffness and architecture govern intracellular rheology in cancer. *Biophys J* **97**, 1013-21 (2009).
12. Tibbitt, M.W. & Anseth, K.S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng* **103**, 655-63 (2009).
13. Chen, R.R. & Mooney, D.J. Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering. *Pharm Res* **20**, 1103-12 (2003).
14. Birgersdotter, A., Sandberg, R. & Ernberg, I. Gene expression perturbation in vitro--a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Semin Cancer Biol* **15**, 405-12 (2005).
15. Kapałczyńska, M. et al. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of medical science : AMS* **14**, 910-919 (2018).
16. Skalak, R.F.C.F. Tissue engineering : proceedings of a workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26-29, 1988. (Liss, New York).
17. Jauregui, H.O. & Gann, K.L. Mammalian hepatocytes as a foundation for treatment in human liver failure. *J Cell Biochem* **45**, 359-65 (1991).
18. 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 (2010).
19. Boland, T., Mironov, V., Gutowska, A., Roth, E.A. & Markwald, R.R. Cell and organ printing 2: Fusion of cell aggregates in three-dimensional gels. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* **272A**, 497-502 (2003).
20. Mironov, V., Kasyanov, V., Drake, C. & Markwald, R.R. Organ printing: promises and challenges. *Regen Med* **3**, 93-103 (2008).

21. Marga, F. et al. Toward engineering functional organ modules by additive manufacturing. *Biofabrication* **4**, 022001 (2012).
22. Gudapati, H., Dey, M. & Ozbolat, I. A comprehensive review on droplet-based bioprinting: Past, present and future. *Biomaterials* **102**, 20-42 (2016).
23. Ozbolat, I.T. & Hospodiuk, M. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials* **76**, 321-43 (2016).
24. Poldervaart, M.T. et al. Sustained release of BMP-2 in bioprinted alginate for osteogenicity in mice and rats. *PLoS One* **8**, e72610 (2013).
25. Kolesky, D.B. et al. Bioprinting: 3D Bioprinting of Vascularized, Heterogeneous Cell-Laden Tissue Constructs (Adv. Mater. 19/2014). *Advanced Materials* **26**, 2966-2966 (2014).
26. Lee, W. et al. Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication. *Biomaterials* **30**, 1587-95 (2009).
27. Godoy, P. et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol* **87**, 1315-530 (2013).
28. Fay, C.D. Computer-Aided Design and Manufacturing (CAD/CAM) for Bioprinting. in *3D Bioprinting: Principles and Protocols* (ed. Crook, J.M.) 27-41 (Springer US, New York, NY, 2020).
29. Sun, W., Starly, B., Nam, J. & Darling, A. Bio-CAD modeling and its applications in computer-aided tissue engineering. *Comput. Aided Des.* **37**, 1097-1114 (2005).
30. Markstedt, K. et al. 3D Bioprinting Human Chondrocytes with Nanocellulose-Alginate Bioink for Cartilage Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules* **16**, 1489-96 (2015).
31. Kesti, M. et al. Bioprinting: Bioprinting Complex Cartilaginous Structures with Clinically Compliant Biomaterials (Adv. Funct. Mater. 48/2015). *Advanced Functional Materials* **25**, 7397-7397 (2015).
32. Duan, B., Hockaday, L.A., Kang, K.H. & Butcher, J.T. 3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *J Biomed Mater Res A* **101**, 1255-64 (2013).
33. Anupama Sekar, J. et al. 3D Bioprinting in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Current Landscape and Future Prospects. in *Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: From Basic Concepts to State of the Art Approaches* (eds. Bhaskar, B., Sreenivasa Rao, P., Kasoju, N., Nagarjuna, V. & Baadhe, R.R.) 561-580 (Springer Singapore, Singapore, 2021).
34. Derakhshanfar, S. et al. 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances. *Bioactive Materials* **3**, 144-156 (2018).
35. Papaioannou, T.G. et al. 3D Bioprinting Methods and Techniques: Applications on Artificial Blood Vessel Fabrication. *Acta Cardiologica Sinica* **35**, 284-289 (2019).
36. Selimis, A., Mironov, V. & Farsari, M. Direct laser writing: Principles and materials for scaffold 3D printing. *Microelectronic Engineering* **132**, 83-89 (2015).
37. Yue, Z., Liu, X., Coates, P.T. & Wallace, G.G. Advances in printing biomaterials and living cells: implications for islet cell transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* **21**, 467-75 (2016).
38. Xu, C. et al. Study of Droplet Formation Process during Drop-on-Demand Inkjetting of Living Cell-Laden Bioink. *Langmuir* **30**, 9130-9138 (2014).
39. Hölzl, K. et al. Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *Biofabrication* **8**, 032002 (2016).

40. Seol, Y.J., Kang, H.W., Lee, S.J., Atala, A. & Yoo, J.J. Bioprinting technology and its applications. *Eur J Cardiothorac Surg* **46**, 342-8 (2014).
41. Guillotin, B. et al. Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. *Biomaterials* **31**, 7250-7256 (2010).
42. Serra, P. & Piqué, A. Laser-Induced Forward Transfer: Fundamentals and Applications. *Advanced Materials Technologies* **4**, 1800099 (2019).
43. Kang, H.W. et al. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nat Biotechnol* **34**, 312-9 (2016).
44. Skeldon, G., Lucendo-Villarin, B. & Shu, W. Three-dimensional bioprinting of stem-cell derived tissues for human regenerative medicine. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **373**, 20170224 (2018).
45. Melissinaki, V. et al. Direct laser writing of 3D scaffolds for neural tissue engineering applications. *Biofabrication* **3**, 045005 (2011).
46. Dobos, A. et al. Thiol–Gelatin–Norbornene Bioink for Laser-Based High-Definition Bioprinting. *Advanced Healthcare Materials* **n/a**, 1900752.
47. Song, J., Michas, C., Chen, C.S., White, A.E. & Grinstaff, M.W. Controlled Cell Alignment Using Two-Photon Direct Laser Writing-Patterned Hydrogels in 2D and 3D. *Macromolecular Bioscience* **21**, 2100051 (2021).
48. Yeong, W.-Y., Chua, C.-K., Leong, K.-F. & Chandrasekaran, M. Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *Trends in Biotechnology* **22**, 643-652 (2004).
49. Mironov, V., Boland, T., Trusk, T., Forgacs, G. & Markwald, R.R. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends in Biotechnology* **21**, 157-161 (2003).
50. Khoda, A.K.M.B., Ozbolat, I.T. & Koc, B. Engineered Tissue Scaffolds With Variational Porous Architecture. *Journal of Biomechanical Engineering* **133**(2010).
51. Nicodemus, G.D. & Bryant, S.J. Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev* **14**, 149-65 (2008).
52. Wilson, S.A., Cross, L.M., Peak, C.W. & Gaharwar, A.K. Shear-Thinning and Thermo-Reversible Nanoengineered Inks for 3D Bioprinting. *ACS Appl Mater Interfaces* **9**, 43449-43458 (2017).
53. Guvendiren, M., Lu, H.D. & Burdick, J.A. Shear-thinning hydrogels for biomedical applications. *Soft Matter* **8**, 260-272 (2012).
54. Technologies, M. A Basic Introduction to Rheology. (2016).
55. 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 (2020).
56. Chen, M.H. et al. Methods To Assess Shear-Thinning Hydrogels for Application As Injectable Biomaterials. *ACS Biomater Sci Eng* **3**, 3146-3160 (2017).
57. 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 (2019).
58. Murphy, S.V. & Atala, A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol* **32**, 773-85 (2014).
59. Lee, W. et al. Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication. *Biomaterials* **30**, 1587-1595 (2009).
60. Poldervaart, M.T. et al. Sustained Release of BMP-2 in Bioprinted Alginate for Osteogenicity in Mice and Rats. *PLOS ONE* **8**, e72610 (2013).

61. Zhang, W. et al. Cartilage Repair and Subchondral Bone Migration Using 3D Printing Osteochondral Composites: A One-Year-Period Study in Rabbit Trochlea. *BioMed Research International* **2014**, 746138 (2014).
62. Greiner, A.M., Richter, B. & Bastmeyer, M. Micro-engineered 3D scaffolds for cell culture studies. *Macromol Biosci* **12**, 1301-14 (2012).
63. Maruo, S., Nakamura, O. & Kawata, S. Three-dimensional microfabrication with two-photon-absorbed photopolymerization. *Optics Letters* **22**, 132-134 (1997).
64. Ovsianikov, A. & Chichkov, B. Three-Dimensional Microfabrication by Two-Photon Polymerization Technique. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **868**, 311-25 (2012).
65. Ovsianikov, A. & Chichkov, B.N. Three-dimensional microfabrication by two-photon polymerization technique. *Methods Mol Biol* **868**, 311-25 (2012).
66. Williams, R.M., Zipfel, W.R. & Webb, W.W. Multiphoton microscopy in biological research. *Current Opinion in Chemical Biology* **5**, 603-608 (2001).
67. Hippler, M. et al. 3D Scaffolds to Study Basic Cell Biology. *Advanced Materials* **31**, 1808110 (2019).
68. Lim, K.S. et al. Bio-resin for high resolution lithography-based biofabrication of complex cell-laden constructs. *Biofabrication* **10**, 034101 (2018).
69. Jungst, T., Smolan, W., Schacht, K., Scheibel, T. & Groll, J. Strategies and Molecular Design Criteria for 3D Printable Hydrogels. *Chemical Reviews* **116**, 1496-1539 (2016).
70. Pereira, R.F. & Bártolo, P.J. 3D bioprinting of photocrosslinkable hydrogel constructs. *Journal of Applied Polymer Science* **132**(2015).
71. Review: Bioprinting: A Beginning. *Tissue Engineering* **12**, 631-634 (2006).
72. Kashte, S., Jaiswal, A.K. & Kadam, S. Artificial Bone via Bone Tissue Engineering: Current Scenario and Challenges. *Tissue engineering and regenerative medicine* **14**, 1-14 (2017).
73. Drury, J.L. & Mooney, D.J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* **24**, 4337-4351 (2003).
74. Ogneva, I.V. Cell Mechanosensitivity: Mechanical Properties and Interaction with Gravitational Field. *BioMed Research International* **2013**, 598461 (2013).
75. Discher, D.E., Janmey, P. & Wang, Y.L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* **310**, 1139-43 (2005).
76. Ovsianikov, A., Mironov, V., Stampfl, J. & Liska, R. Engineering 3D cell-culture matrices: multiphoton processing technologies for biological and tissue engineering applications. *Expert Review of Medical Devices* **9**, 613-633 (2012).
77. Levato, R. et al. Biofabrication of tissue constructs by 3D bioprinting of cell-laden microcarriers. *Biofabrication* **6**, 035020 (2014).
78. Nguyen, K.T. & West, J.L. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials* **23**, 4307-4314 (2002).
79. Bolívar-Monsalve, E.J. et al. Engineering bioactive synthetic polymers for biomedical applications: a review with emphasis on tissue engineering and controlled release. *Materials Advances* **2**, 4447-4478 (2021).
80. Dippold, D. et al. Investigation of the batch-to-batch inconsistencies of Collagen in PCL-Collagen nanofibers. *Materials Science and Engineering: C* **95**, 217-225 (2019).
81. Van Hoorick, J. et al. Indirect additive manufacturing as an elegant tool for the production of self-supporting low density gelatin scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **26**, 247 (2015).
82. Tan, H. & Marra, K.G. Injectable, Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Materials* **3**, 1746-1767 (2010).

83. Ahmed, E.M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research* **6**, 105-121 (2015).
84. Jeon, O., Powell, C., Solorio, L.D., Krebs, M.D. & Alsberg, E. Affinity-based growth factor delivery using biodegradable, photocrosslinked heparin-alginate hydrogels. *Journal of Controlled Release* **154**, 258-266 (2011).
85. Lin, C.-C., Raza, A. & Shih, H. PEG hydrogels formed by thiol-ene photo-click chemistry and their effect on the formation and recovery of insulin-secreting cell spheroids. *Biomaterials* **32**, 9685-9695 (2011).
86. Caló, E. & Khutoryanskiy, V.V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal* **65**, 252-267 (2015).
87. Spargo, B.J. et al. Spatially controlled adhesion, spreading, and differentiation of endothelial cells on self-assembled molecular monolayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11070-4 (1994).
88. Gonzalez-Gaitan, M. & Jackle, H. Invagination centers within the Drosophila stomatogastric nervous system anlage are positioned by Notch-mediated signaling which is spatially controlled through wingless. *Development* **121**, 2313-25 (1995).
89. Benton, J.A., DeForest, C.A., Vivekanandan, V. & Anseth, K.S. Photocrosslinking of gelatin macromers to synthesize porous hydrogels that promote valvular interstitial cell function. *Tissue Eng Part A* **15**, 3221-30 (2009).
90. Kim, J.E., Kim, S.H. & Jung, Y. Current status of three-dimensional printing inks for soft tissue regeneration. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **13**, 636-646 (2016).
91. Ruoslahti, E. RGD AND OTHER RECOGNITION SEQUENCES FOR INTEGRINS. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **12**, 697-715 (1996).
92. Gasperini, L., Mano, J.F. & Reis, R.L. Natural polymers for the microencapsulation of cells. *Journal of The Royal Society Interface* **11**, 20140817 (2014).
93. Billiet, T., Vandenhaute, M., Schelfhout, J., Van Vlierberghe, S. & Dubruel, P. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. *Biomaterials* **33**, 6020-41 (2012).
94. Zhu, J. & Marchant, R.E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices* **8**, 607-26 (2011).
95. 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 (2016).
96. Hersel, U., Dahmen, C. & Kessler, H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* **24**, 4385-4415 (2003).
97. Mann, B.K., Gobin, A.S., Tsai, A.T., Schmedlen, R.H. & West, J.L. Smooth muscle cell growth in photopolymerized hydrogels with cell adhesive and proteolytically degradable domains: synthetic ECM analogs for tissue engineering. *Biomaterials* **22**, 3045-3051 (2001).
98. Berkovitch, Y. & Seliktar, D. Semi-synthetic hydrogel composition and stiffness regulate neuronal morphogenesis. *International Journal of Pharmaceutics* **523**, 545-555 (2017).
99. Yue, K. et al. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials* **73**, 254-71 (2015).
100. Van Vlierberghe, S., Dubruel, P. & Schacht, E. Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Biomacromolecules* **12**, 1387-1408 (2011).
101. Ullah, F., Othman, M.B.H., Javed, F., Ahmad, Z. & Akil, H.M. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C* **57**, 414-433 (2015).

102. Dababneh, A.B. & Ozbolat, I.T. Bioprinting Technology: A Current State-of-the-Art Review. *Journal of Manufacturing Science and Engineering* **136**(2014).
103. Mignon, A. et al. pH-sensitive superabsorbent polymers: a potential candidate material for self-healing concrete. *Journal of Materials Science* **50**, 970-979 (2015).
104. Lee, K.Y. & Mooney, D.J. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science* **37**, 106-126 (2012).
105. Xing, Q. et al. Increasing Mechanical Strength of Gelatin Hydrogels by Divalent Metal Ion Removal. *Scientific Reports* **4**, 4706 (2014).
106. Buwalda, S.J., Dijkstra, P.J., Calucci, L., Forte, C. & Feijen, J. Influence of amide versus ester linkages on the properties of eight-armed PEG-PLA star block copolymer hydrogels. *Biomacromolecules* **11**, 224-32 (2010).
107. de Jong, S.J., van Dijk-Wolthuis, W.N.E., Kettenes-van den Bosch, J.J., Schuyl, P.J.W. & Hennink, W.E. Monodisperse Enantiomeric Lactic Acid Oligomers: Preparation, Characterization, and Stereocomplex Formation. *Macromolecules* **31**, 6397-6402 (1998).
108. Burdick, J.A. & Prestwich, G.D. Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications. *Advanced Materials* **23**, H41-H56 (2011).
109. Censi, R., Fieten, P.J., Di Martino, P., Hennink, W.E. & Vermonden, T. In-situ forming hydrogels by simultaneous thermal gelling and Michael addition reaction between methacrylate bearing thermosensitive triblock copolymers and thiolated hyaluronan. *J Control Release* **148**, e28-9 (2010).
110. Ovsianikov, A. et al. Laser Fabrication of 3D Gelatin Scaffolds for the Generation of Bioartificial Tissues. *Materials* **4**, 288-299 (2011).
111. Sivashanmugam, A., Arun Kumar, R., Vishnu Priya, M., Nair, S.V. & Jayakumar, R. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering. *European Polymer Journal* **72**, 543-565 (2015).
112. Le Droumaguet, B. & Velonia, K. Click Chemistry: A Powerful Tool to Create Polymer-Based Macromolecular Chimeras. *Macromolecular Rapid Communications* **29**, 1073-1089 (2008).
113. Baskin, J.M. et al. Copper-free click chemistry for dynamic *in vivo* imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 16793-16797 (2007).
114. Takahashi, A. et al. In Situ Cross-Linkable Hydrogel of Hyaluronan Produced via Copper-Free Click Chemistry. *Biomacromolecules* **14**, 3581-3588 (2013).
115. Han, S.-S. et al. In situ cross-linkable hyaluronic acid hydrogels using copper free click chemistry for cartilage tissue engineering. *Polymer Chemistry* **9**, 20-27 (2018).
116. Akhtar, M.F., Hanif, M. & Ranjha, N.M. Methods of synthesis of hydrogels ... A review. *Saudi Pharmaceutical Journal* **24**, 554-559 (2016).
117. Billiet, T., Gevaert, E., De Schryver, T., Cornelissen, M. & Dubruel, P. The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability. *Biomaterials* **35**, 49-62 (2014).
118. Mendes-Felipe, C., Oliveira, J., Etxebarria, I., Vilas-Vilela, J.L. & Lanceros-Mendez, S. State-of-the-Art and Future Challenges of UV Curable Polymer-Based Smart Materials for Printing Technologies. *Advanced Materials Technologies* **4**, 1800618 (2019).
119. Van Den Bulcke, A.I. et al. Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels. *Biomacromolecules* **1**, 31-38 (2000).
120. Malkoch, M. et al. Synthesis of well-defined hydrogel networks using Click chemistry. *Chemical Communications*, 2774-2776 (2006).

121. Young, A.T., White, O.C. & Daniele, M.A. Rheological Properties of Coordinated Physical Gelation and Chemical Crosslinking in Gelatin Methacryloyl (GelMA) Hydrogels. *Macromolecular Bioscience* **20**, 2000183 (2020).
122. Chandran, N., C, S. & Thomas, S. Chapter 1 - Introduction to rheology. in *Rheology of Polymer Blends and Nanocomposites* (eds. Thomas, S., Sarathchandran, C. & Chandran, N.) 1-17 (Elsevier, 2020).
123. Skardal, A. et al. Photocrosslinkable hyaluronan-gelatin hydrogels for two-step bioprinting. *Tissue Eng Part A* **16**, 2675-85 (2010).
124. Suntonnond, R., An, J. & Chua, C.K. Bioprinting of Thermoresponsive Hydrogels for Next Generation Tissue Engineering: A Review. *Macromolecular Materials and Engineering* **302**, 1600266 (2017).
125. Mezger, T.-. *Angewandte Rheologie mit Joe Flow auf der Rheologie-Straße*, (Paar, 2014).
126. Bonn, D. & Denn, M.M. Yield Stress Fluids Slowly Yield to Analysis. *Science* **324**, 1401-1402 (2009).
127. Schwarz, S. et al. Contactless Vibrational Analysis of Transparent Hydrogel Structures Using Laser-Doppler Vibrometry. *Experimental Mechanics* **60**, 1067-1078 (2020).
128. Ahadian, S. et al. A contactless electrical stimulator: application to fabricate functional skeletal muscle tissue. *Biomedical Microdevices* **15**, 109-115 (2013).
129. Inc., R. (2021).
130. Haase, S. Ultra-schnell aushärtende Hydrogele als Biotinten für den 3D-Biodruck. (2021).
131. Zheng, F. et al. Organ-on-a-Chip Systems: Microengineering to Biomimic Living Systems. *Small* **12**, 2253-2282 (2016).
132. Frame, M.D., Chapman, G.B., Makino, Y. & Sarelius, I.H. Shear stress gradient over endothelial cells in a curved microchannel system. *Biorheology* **35**, 245-61 (1998).
133. Huh, D. et al. Microfabrication of human organs-on-chips. *Nat Protoc* **8**, 2135-57 (2013).
134. 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 Science OA* **3**, FSO191 (2017).
135. Yoon No, D., Lee, K.H., Lee, J. & Lee, S.H. 3D liver models on a microplatform: well-defined culture, engineering of liver tissue and liver-on-a-chip. *Lab Chip* **15**, 3822-37 (2015).
136. Kappings, V. et al. vasQchip: A Novel Microfluidic, Artificial Blood Vessel Scaffold for Vascularized 3D Tissues. *Advanced Materials Technologies* **3**, 1700246 (2018).
137. Hu, N. & Zhang, Y.S. 18 - 3D bioprinting blood vessels. in *3D Bioprinting for Reconstructive Surgery* (eds. Thomas, D.J., Jessop, Z.M. & Whitaker, I.S.) 377-391 (Woodhead Publishing, 2018).
138. Zhou, X. et al. 3D Bioprinting-Tunable Small-Diameter Blood Vessels with Biomimetic Biphasic Cell Layers. *ACS Applied Materials & Interfaces* **12**, 45904-45915 (2020).
139. Ramasamy, S.K. Structure and Functions of Blood Vessels and Vascular Niches in Bone. *Stem cells international* **2017**, 5046953-5046953 (2017).
140. Potente, M., Gerhardt, H. & Carmeliet, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* **146**, 873-87 (2011).
141. Ramasamy, S.K., Kusumbe, A.P. & Adams, R.H. Regulation of tissue morphogenesis by endothelial cell-derived signals. *Trends in Cell Biology* **25**, 148-157 (2015).
142. Bruce Alberts, A.J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. *Molecular Biology of the Cell, 4th edition*, (2002).

143. Kumar, V.A., Brewster, L.P., Caves, J.M. & Chaikof, E.L. Tissue Engineering of Blood Vessels: Functional Requirements, Progress, and Future Challenges. *Cardiovascular engineering and technology* **2**, 137-148 (2011).
144. Thiele, J., Ma, Y., Bruekers, S.M.C., Ma, S. & Huck, W.T.S. 25th Anniversary Article: Designer Hydrogels for Cell Cultures: A Materials Selection Guide. *Advanced Materials* **26**, 125-148 (2014).
145. Daley, W.P., Peters, S.B. & Larsen, M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *Journal of Cell Science* **121**, 255-264 (2008).
146. Slaughter, B.V., Khurshid, S.S., Fisher, O.Z., Khademhosseini, A. & Peppas, N.A. Hydrogels in Regenerative Medicine. *Advanced Materials* **21**, 3307-3329 (2009).
147. Fernandes, H., Moroni, L., van Blitterswijk, C. & de Boer, J. Extracellular matrix and tissue engineering applications. *Journal of Materials Chemistry* **19**, 5474-5484 (2009).
148. Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B., López-Caballero, M.E. & Montero, M.P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids* **25**, 1813-1827 (2011).
149. Wenger, M.P.E., Bozec, L., Horton, M.A. & Mesquida, P. Mechanical properties of collagen fibrils. *Biophysical journal* **93**, 1255-1263 (2007).
150. America, G.M.I.o. *Gelatin Handbook* (2019).
151. Graf, E. Lexikon der Pharmazie. Hrsg. von S. Ebel und H. J. Roth, G. Thieme-Verlag Stuttgart 1987, X, 704 S., 2177 Formeln und Abb., geb. DM 128,-. *Pharmazie in unserer Zeit* **16**, 131-131 (1987).
152. Kuijpers, A.J. et al. In vivo compatibility and degradation of crosslinked gelatin gels incorporated in knitted Dacron. *Journal of Biomedical Materials Research* **51**, 136-145 (2000).
153. Kozlov, P.V. & Burdygina, G.I. The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification. *Polymer* **24**, 651-666 (1983).
154. Göckler, T. et al. Tuning Superfast Curing Thiol-Norbornene-Functionalized Gelatin Hydrogels for 3D Bioprinting. *Advanced Healthcare Materials* **10**, 2100206 (2021).
155. Eastoe, J.E. The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin. *Biochemical Journal* **61**, 589-600 (1955).
156. Kühn, K. Struktur und Biochemie des Kollagens. *Chemie in unserer Zeit* **8**, 97-103 (1974).
157. Göckler, T. Chemisch-biologisches Design von Biomaterialien und Biotinten für lichtbasierte Biofabrikationsprozesse im Tissue Engineering. (2021).
158. Kale, R.N. & Bajaj, A.N. Ultraviolet Spectrophotometric Method for Determination of Gelatin Crosslinking in the Presence of Amino Groups. *Journal of Young Pharmacists* **2**, 90-94 (2010).
159. D'Souza, S.E., Ginsberg, M.H. & Plow, E.F. Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. *Trends Biochem Sci* **16**, 246-50 (1991).
160. Yue, K. et al. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials* **73**, 254-271 (2015).
161. Shih, H. & Lin, C.C. Cross-linking and degradation of step-growth hydrogels formed by thiol-ene photoclick chemistry. *Biomacromolecules* **13**, 2003-12 (2012).
162. Muñoz, Z., Shih, H. & Lin, C.-C. Gelatin hydrogels formed by orthogonal thiol-norbornene photochemistry for cell encapsulation. *Biomaterials Science* **2**, 1063-1072 (2014).
163. Lin, C.-C., Ki, C.S. & Shih, H. Thiol-norbornene photo-click hydrogels for tissue engineering applications. *Journal of applied polymer science* **132**, 41563 (2015).
164. ThermoFisherScientific. The Crosslinking Reagents Handbook.

165. Hoorick, J. et al. Highly Reactive Thiol-Norbornene Photo-Click Hydrogels: Toward Improved Processability. *Macromolecular Rapid Communications* **39**, 1800181 (2018).
166. Van Vlierberghe, S., Schacht, E. & Dubruel, P. *Reversible gelatin-based hydrogels: Finetuning of material properties*, 1039-1047 (2011).
167. White, F.H., Jr. & Sandoval, A. The thiolation of ribonuclease. *Biochemistry* **1**, 938-46 (1962).
168. Zheng, Z. et al. Visible Light-Induced 3D Bioprinting Technologies and Corresponding Bioink Materials for Tissue Engineering: A Review. *Engineering* (2020).
169. Nguyen, A.K., Goering, P.L., Elespuru, R.K., Sarkar Das, S. & Narayan, R.J. The Photoinitiator Lithium Phenyl (2,4,6-Trimethylbenzoyl) Phosphinate with Exposure to 405 nm Light Is Cytotoxic to Mammalian Cells but Not Mutagenic in Bacterial Reverse Mutation Assays. *Polymers* **12**, 1489 (2020).
170. de Grujil, F.R. Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB Radiation. *Skin Pharmacology and Physiology* **15**, 316-320 (2002).
171. Moan, J. & Peak, M.J. Effects of UV radiation on cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **4**, 21-34 (1989).
172. 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**, 202-8 (2013).
173. Chen, Y.-C. et al. Functional Human Vascular Network Generated in Photocrosslinkable Gelatin Methacrylate Hydrogels. *Advanced functional materials* **22**, 2027-2039 (2012).
174. Truong, V.X. et al. Photodegradable Gelatin-Based Hydrogels Prepared by Bioorthogonal Click Chemistry for Cell Encapsulation and Release. *Biomacromolecules* **16**, 2246-2253 (2015).
175. Hoyle, C.E. & Bowman, C.N. Thiol-Ene Click Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 1540-1573 (2010).
176. Guo, K. et al. Collagen-Based Thiol-Norbornene Photoclick Bio-Ink with Excellent Bioactivity and Printability. *ACS Applied Materials & Interfaces* **13**, 7037-7050 (2021).
177. Mansbridge, J. Commercial considerations in tissue engineering. *Journal of Anatomy* **209**, 527-532 (2006).
178. Pudlas, M., Koch, S., Bolwien, C. & Walles, H. Raman Spectroscopy as a Tool for Quality and Sterility Analysis for Tissue Engineering Applications like Cartilage Transplants. *The International Journal of Artificial Organs* **33**, 228-237 (2010).
179. Galante, R., Pinto, T.J.A., Colaço, R. & Serro, A.P. Sterilization of hydrogels for biomedical applications: A review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **106**, 2472-2492 (2018).
180. Galante, R., Pinto, T.J.A., Colaço, R. & Serro, A.P. Sterilization of hydrogels for biomedical applications: A review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **106**, 2472-2492 (2018).
181. Kalia, V. & Joseph, D. Medicine: Sterilization. in *Encyclopedia of Nuclear Energy* (ed. Greenspan, E.) 224-235 (Elsevier, Oxford, 2021).
182. Harrell, C.R., Djonov, V., Fellabaum, C. & Volarevic, V. Risks of Using Sterilization by Gamma Radiation: The Other Side of the Coin. *International journal of medical sciences* **15**, 274-279 (2018).
183. Shintani, H. Ethylene Oxide Gas Sterilization of Medical Devices. *Biocontrol Sci* **22**, 1-16 (2017).
184. Prevention, C.f.D.C.a. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities (2008). (2008).

185. Kim, T.D., Ryu, H.J., Cho, H.I., Yang, C.-H. & Kim, J. Thermal Behavior of Proteins: Heat-Resistant Proteins and Their Heat-Induced Secondary Structural Changes. *Biochemistry* **39**, 14839-14846 (2000).
186. Fuchs, G. *Allgemeine Mikrobiologie*, (2006).
187. Axel Kramer, O.A., Martin Exner, Nils-Olaf Hübner. Krankenhaus- und Praxishygiene. (2016).
188. Ames, W.M. Heat degradation of gelatin. *Journal of the Society of Chemical Industry* **66**, 279-284 (1947).
189. O'Connell, C.D. et al. Evaluation of sterilisation methods for bio-ink components: gelatin, gelatin methacryloyl, hyaluronic acid and hyaluronic acid methacryloyl. *Biofabrication* **11**, 035003 (2019).
190. Barbara Vanhoecke, J.O. Influence of autoclave sterilization of gelatin on physical properties and endotoxin level and the influence of endotoxin level on endothelial cellular activity. (2018).
191. ThermoFisherScientific. Understand the Basics of Fetal Bovine Serum (FBS).
192. Grimm, A.L. Synthese und Charakterisierung gelatinebasierter Hydrogele. (2020).
193. Neumann, K.-H. & Neumann, K.H. Pflanzliche Zell- und Gewebekulturen: eine Einführung ; 72 Tabellen, (Ulmer, Stuttgart, 1995).
194. Miyazaki, H. et al. A novel strategy to engineer pre-vascularized 3-dimensional skin substitutes to achieve efficient, functional engraftment. *Scientific Reports* **9**, 7797 (2019).
195. Tschumperlin, D.J. Fibroblasts and the ground they walk on. *Physiology (Bethesda, Md.)* **28**, 380-390 (2013).
196. Williams, I.R. Fibroblasts. in *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)* (ed. Delves, P.J.) 905-909 (Elsevier, Oxford, 1998).
197. Murray, L.A., Knight, D.A. & Laurent, G.J. Chapter 15 - Fibroblasts. in *Asthma and COPD (Second Edition)* (eds. Barnes, P.J., Drazen, J.M., Rennard, S.I. & Thomson, N.C.) 193-200 (Academic Press, Oxford, 2009).
198. Brooks, A.N., Turkarlan, S., Beer, K.D., Lo, F.Y. & Baliga, N.S. Adaptation of cells to new environments. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **3**, 544-61 (2011).
199. Greene, T. & Lin, C.-C. 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).
200. Nichol, J.W. et al. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials* **31**, 5536-44 (2010).
201. Weber, L.M., Lopez, C.G. & Anseth, K.S. Effects of PEG hydrogel crosslinking density on protein diffusion and encapsulated islet survival and function. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **90A**, 720-729 (2009).
202. Reinhart, C.T. & Peppas, N.A. Solute diffusion in swollen membranes. Part II. Influence of crosslinking on diffusive properties. *Journal of Membrane Science* **18**, 227-239 (1984).
203. Ahsan, S.M. & Rao, C.M. Structural studies on aqueous gelatin solutions: Implications in designing a thermo-responsive nanoparticulate formulation. *International Journal of Biological Macromolecules* **95**, 1126-1134 (2017).
204. Chang, R. Effects of Dispensing Pressure and Nozzle Diameter on Cell Survival from Solid Freeform Fabrication-Based Direct Cell Writing. *Tissue Engineering Part A* **14**, 41-48 (2008).
205. Pfister, R. *In vitro Rekonstruktion der neurovaskulären Einheit auf dem Chip*, (Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2021).
206. Hebeiß, I. Ph.D. thesis, (2012).

207. Ivannikov, D. Ph.D. thesis, (2016).
208. Neuwelt, E.A. et al. Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nature Reviews Neuroscience* **12**, 169-182 (2011).
209. Miller, D.S. Regulation of P-glycoprotein and other ABC drug transporters at the blood-brain barrier. *Trends in pharmacological sciences* **31**, 246-254 (2010).
210. Armulik, A., Abramsson, A. & Betsholtz, C. Endothelial/Pericyte Interactions. *Circulation Research* **97**, 512-523 (2005).
211. Wolf, S., Seehaus, B., Minol, K. & Günter Gassen, H. Die Blut-Hirn-Schranke: Eine Besonderheit des cerebralen mikrozirkulationssystems. *Naturwissenschaften* **83**, 302-311 (1996).
212. Abbott, N.J., Rönnbäck, L. & Hansson, E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience* **7**, 41-53 (2006).
213. Lee, V.K. et al. Creating perfused functional vascular channels using 3D bio-printing technology. *Biomaterials* **35**, 8092-8102 (2014).
214. Groll, J. et al. Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. *Biofabrication* **8**, 013001 (2016).
215. Suntornnond, R., An, J. & Chua, C.K. Roles of support materials in 3D bioprinting - Present and future. *International journal of bioprinting* **3**, 006-006 (2017).
216. Sarwat F. Khatkhat, S.R.B., and Susan C. Roberts. Pluronic F127 as a Cell Encapsulation Material: Utilization of Membrane-Stabilizing Agents. *Tissue Engineering* **11**, 974-983 (2005).
217. Secomb, T.W., Hsu, R. & Pries, A.R. Effect of the endothelial surface layer on transmission of fluid shear stress to endothelial cells. *Biorheology* **38**, 143-150 (2001).
218. Van Hoorick, J. et al. Highly Reactive Thiol-Norbornene Photo-Click Hydrogels: Toward Improved Processability. *Macromolecular Rapid Communications* **39**, 1800181 (2018).
219. Hasselmann, N.F., Hackmann, M.J. & Horn, W. Two-photon fabrication of hydrogel microstructures for excitation and immobilization of cells. *Biomedical Microdevices* **20**, 8 (2017).
220. Mayer, F. et al. Multimaterial 3D laser microprinting using an integrated microfluidic system. *Science Advances* **5**, eaau9160 (2019).
221. Müller-Esterl, W. Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler - Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger, (Springer-Verlag, 2017).
222. Feser, D. Untersuchung der Eignung von peptoidbasierten Crosslinkern für Hydrogele in der 3D Zellkultur. (2019).
223. Leopold, S. Synthese und Quervernetzung von gelatinebasierten Hydrogelen mit Peptoidcrosslinkern für die 3D Zellkultur. (2020).
224. Wien, J. Evaluierung verschiedener Vernetzer für gelatinebasierte Hydrogele für den Einsatz im Tissue Engineering. (2021).
225. Battigelli, A. Design and preparation of organic nanomaterials using self-assembled peptoids. *Biopolymers* **110**, e23265 (2019).
226. Herlan, C.N., Meschkov, A., Schepers, U. & Bräse, S. Cyclic Peptoid-Peptide Hybrids as Versatile Molecular Transporters. *Front Chem* **9**, 696957 (2021).
227. Kim, H.-S., Lee, Y., Shin, M.H. & Lim, H.-S. Cell-penetrating, amphipathic cyclic peptoids as molecular transporters for cargo delivery. *Chemical Communications* **57**, 6800-6803 (2021).
228. Godballe, T., Nilsson, L.L., Petersen, P.D. & Jenssen, H. Antimicrobial β -Peptides and α -Peptoids. *Chemical Biology & Drug Design* **77**, 107-116 (2011).

229. Wehl, I.D.M. Ph.D. thesis, (2019).
230. Zuckermann, R.N., Kerr, J.M., Kent, S.B.H. & Moos, W.H. Efficient method for the preparation of peptoids [oligo(N-substituted glycines)] by submonomer solid-phase synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **114**, 10646-10647 (1992).
231. Tran, H., Gael, S.L., Connolly, M.D. & Zuckermann, R.N. Solid-phase submonomer synthesis of peptoid polymers and their self-assembly into highly-ordered nanosheets. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e3373-e3373 (2011).
232. Kumar, P. et al. Antimicrobial Peptide–Polymer Conjugates with High Activity: Influence of Polymer Molecular Weight and Peptide Sequence on Antimicrobial Activity, Proteolysis, and Biocompatibility. *ACS Applied Materials & Interfaces* **9**, 37575-37586 (2017).
233. Lowe, A.B., Hoyle, C.E. & Bowman, C.N. Thiol-yne click chemistry: A powerful and versatile methodology for materials synthesis. *Journal of Materials Chemistry* **20**, 4745-4750 (2010).
234. Noshadi, I. et al. Engineering Biodegradable and Biocompatible Bio-ionic Liquid Conjugated Hydrogels with Tunable Conductivity and Mechanical Properties. *Scientific Reports* **7**, 4345 (2017).
235. Lou, X. & Chirila, T.V. Swelling Behavior and Mechanical Properties of Chemically Cross-Linked Gelatin Gels for Biomedical Use. *Journal of Biomaterials Applications* **14**, 184-191 (1999).
236. Salimi-Kenari, H., Mollaie, F., Dashtimoghadam, E., Imani, M. & Nyström, B. Effects of chain length of the cross-linking agent on rheological and swelling characteristics of dextran hydrogels. *Carbohydrate Polymers* **181**, 141-149 (2018).
237. 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**, 6593-603 (2009).
238. Lutolf, M.P. et al. Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: Engineering cell-invasion characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 5413-5418 (2003).
239. ThermoFisherScientific. Monitoring cell health with alamarBlue and PrestoBlue reagents using the Varioskan LUX Multimode Microplate Reader, (2018).
240. Chung, J.H.Y. et al. Bio-ink properties and printability for extrusion printing living cells. *Biomaterials Science* **1**, 763-773 (2013).
241. Wang, H. et al. Cell-laden photocrosslinked GelMA-DexMA copolymer hydrogels with tunable mechanical properties for tissue engineering. *Journal of materials science. Materials in medicine* **25**(2014).
242. Shirahama, H., Lee, B.H., Tan, L.P. & Cho, N.-J. Precise Tuning of Facile One-Pot Gelatin Methacryloyl (GelMA) Synthesis. *Scientific reports* **6**, 31036-31036 (2016).
243. Tytgat, L. et al. Additive manufacturing of photo-crosslinked gelatin scaffolds for adipose tissue engineering. *Acta Biomaterialia* **94**, 340-350 (2019).
244. Van Hoorick, J. et al. Thiol-norbornene gelatin hydrogels: influence of thiolated crosslinker on network properties and high definition 3D printing. *Biofabrication* **13**, 015017 (2021).
245. FDA. Ethylene Oxide Sterilization for Medical Devices.
246. Webb, B. & Doyle, B.J. Parameter optimization for 3D bioprinting of hydrogels. *Bioprinting* **8**, 8-12 (2017).
247. Miri, A.K. et al. Bioprinters for organs-on-chips. *Biofabrication* **11**, 042002 (2019).

-
248. Zhang, Z., Wang, B., Hui, D., Qiu, J. & Wang, S. 3D bioprinting of soft materials-based regenerative vascular structures and tissues. *Composites Part B: Engineering* **123**, 279-291 (2017).
249. Shao, L. et al. Sacrificial microgel-laden bioink-enabled 3D bioprinting of mesoscale pore networks. *Bio-Design and Manufacturing* **3**, 30-39 (2020).
250. Golden, A.P. & Tien, J. Fabrication of microfluidic hydrogels using molded gelatin as a sacrificial element. *Lab on a Chip* **7**, 720-725 (2007).
251. Guvendiren, M. 3D Bioprinting in Medicine: Technologies, Bioinks, and Applications, (Springer International Publishing, 2019).
252. Gilbert, F., O'Connell, C.D., Mladenovska, T. & Dodds, S. Print Me an Organ? Ethical and Regulatory Issues Emerging from 3D Bioprinting in Medicine. *Sci Eng Ethics* **24**, 73-91 (2018).
253. Stanco, D., Urbán, P., Tirendi, S., Ciardelli, G. & Barrero, J. 3D bioprinting for orthopaedic applications: Current advances, challenges and regulatory considerations. *Bioprinting*, e00103 (2020).
254. Torgersen, J. et al. Photo-sensitive hydrogels for three-dimensional laser microfabrication in the presence of whole organisms. *J Biomed Opt* **17**, 105008 (2012).
255. Di Corato, R. et al. High-resolution cellular MRI: gadolinium and iron oxide nanoparticles for in-depth dual-cell imaging of engineered tissue constructs. *ACS nano* **7**, 7500-7512 (2013).
256. Camci-Unal, G., Cuttica, D., Annabi, N., Demarchi, D. & Khademhosseini, A. Synthesis and characterization of hybrid hyaluronic acid-gelatin hydrogels. *Biomacromolecules* **14**, 1085-1092 (2013).
257. Memic, A. et al. Bioprinting technologies for disease modeling. *Biotechnol Lett* **39**, 1279-1290 (2017).
258. Pedde, R.D. et al. Emerging Biofabrication Strategies for Engineering Complex Tissue Constructs. *Adv Mater* **29**(2017).
259. Neu, C.P., Arastu, H.F., Curtiss, S. & Reddi, A.H. Characterization of engineered tissue construct mechanical function by magnetic resonance imaging. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* **3**, 477-485 (2009).
260. ThermoFisherScientific. *Ellman's Reagent User Guide*, (2011).

9 Anhang

9.1 Sterilität der Photopolymerlösungen

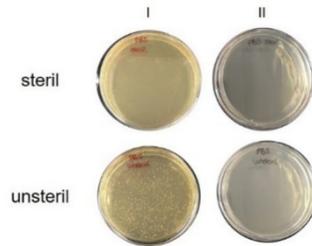


Abbildung 102: Sterilität des zur Lösung der Photopolymere verwendete DPBS⁻. Bei ausschließlich steriler Handhabung des DPBS⁻ war keine Kontamination zu erkennen.

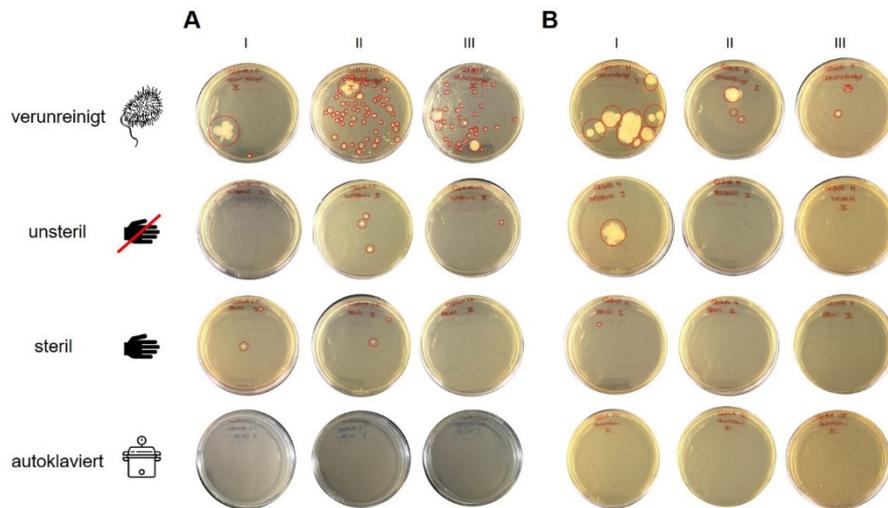


Abbildung 103: Sterilität von unterschiedlich hergestellten GelMA-Lösungen (10 % in DPBS⁻). (A) GelMA1.0, (B) GelMA High.

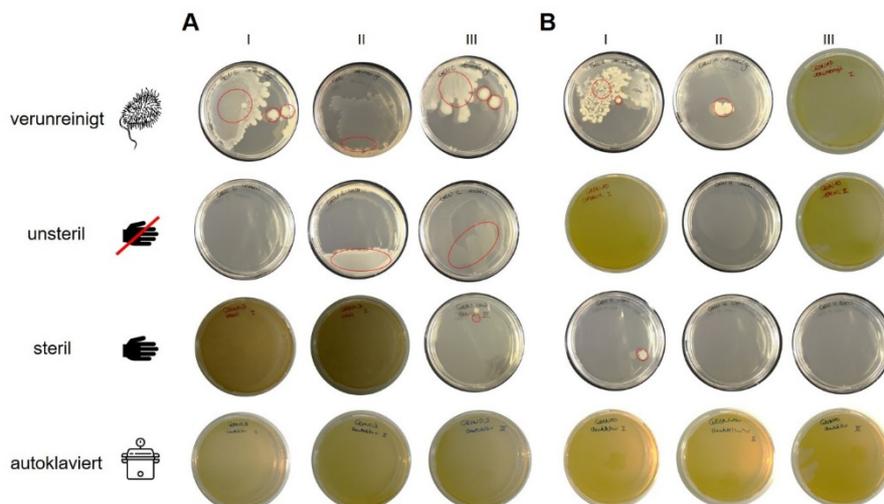


Abbildung 104: Sterilität von unterschiedlich hergestellten GelNB-Lösungen (10 % in DPBS⁻). (A) GelNB Low, (B) GelNB High.

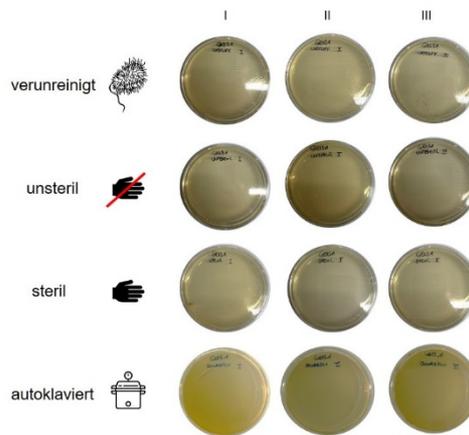


Abbildung 105: Sterilität von unterschiedlich hergestellten GelS Low Lösungen (5 % in DPBS^{-/2}).

9.2 Bestimmung der optimalen Druckparameter

9.2.1 Drucktemperatur

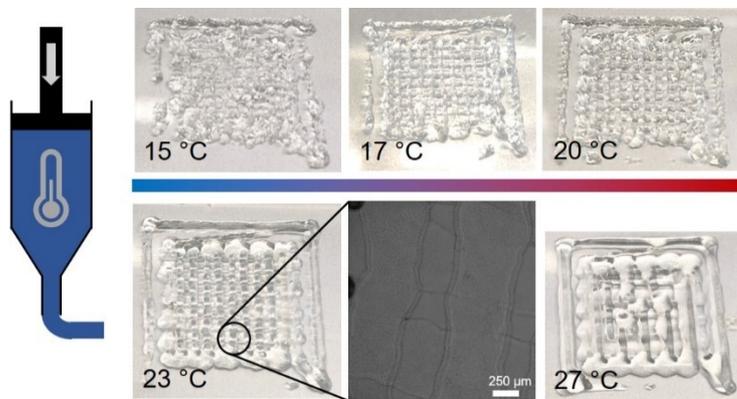


Abbildung 106: Bestimmung der optimalen Drucktemperatur für GelMA1.0 durch eine konische Dosiernadel mit dem ID 250 µm.

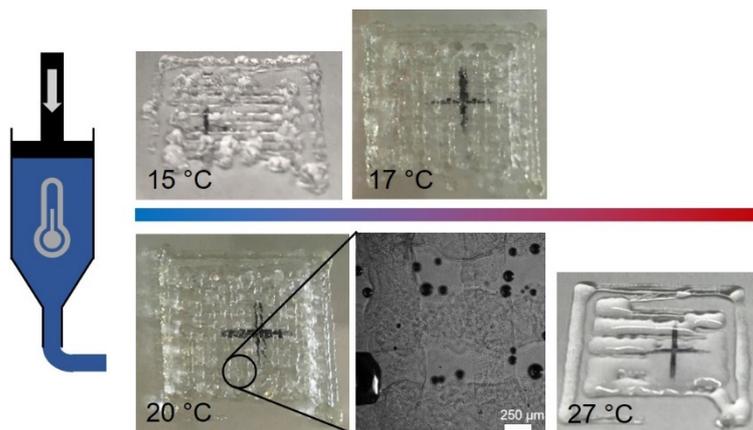


Abbildung 107: Bestimmung der optimalen Drucktemperatur für GelMA High durch eine konische Dosiernadel mit dem ID 250 µm.

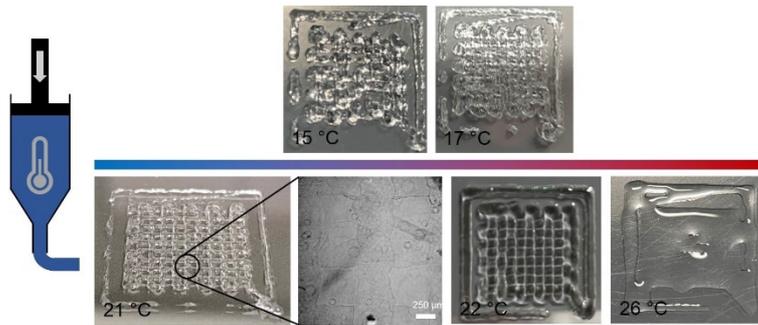


Abbildung 108: Bestimmung der optimalen Drucktemperatur für GelNB/GelS Low durch eine konische Dosiernadel mit dem ID 250 µm.

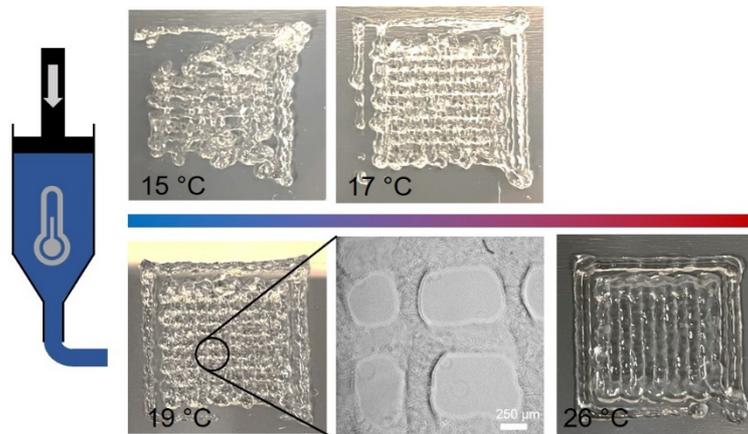


Abbildung 109: Bestimmung der optimalen Drucktemperatur für GelNB/GelS High durch eine konische Dosiernadel mit dem ID 250 µm.

9.2.2 Extrusionsgeschwindigkeit

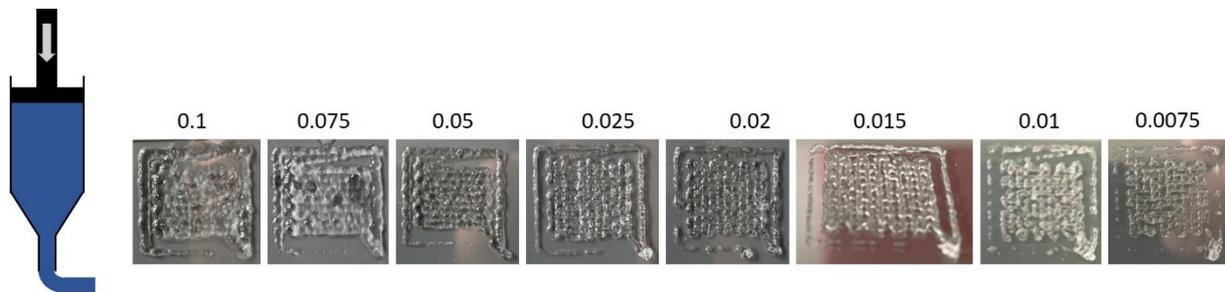


Abbildung 110: Bestimmung der optimalen Extrusionsgeschwindigkeit für GelMA1.0 bei einer Achsengeschwindigkeit von 10 mm/s durch eine konische Dosiernadel mit dem ID 250 µm.

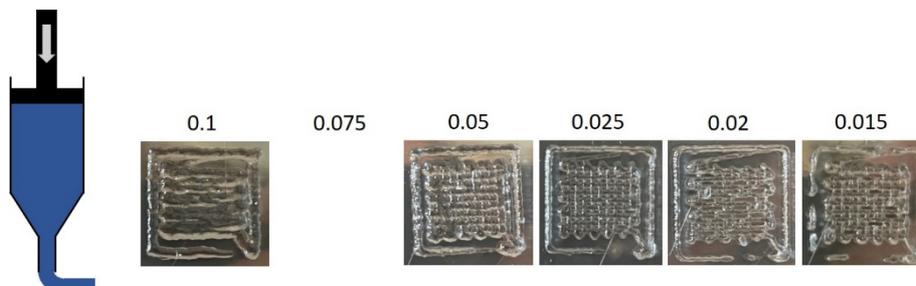


Abbildung 111: Bestimmung der optimalen Extrusionsgeschwindigkeit für GelMA1.0 bei einer Achsengeschwindigkeit von 10 mm/s durch eine konische Dosiernadel mit dem ID 250 µm.

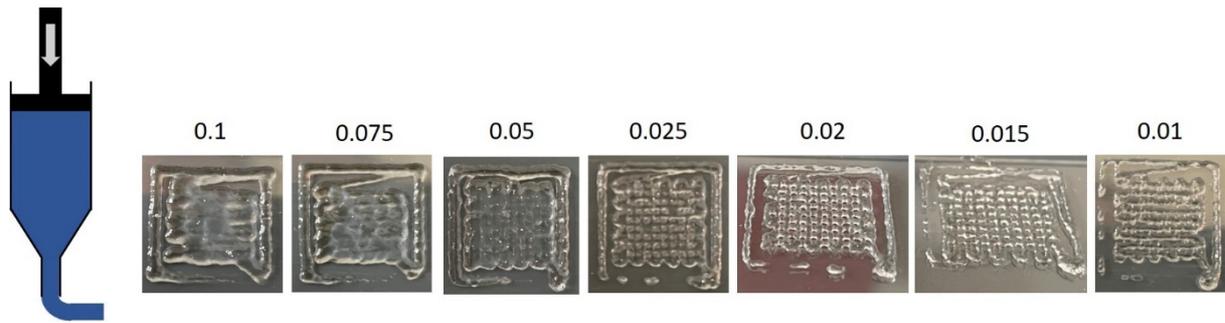


Abbildung 112: Bestimmung der optimalen Extrusionsgeschwindigkeit für GelNB/GelS Low bei einer Achsengeschwindigkeit von 10 mm/s durch eine konische Dosiernadel mit dem ID 250 µm.

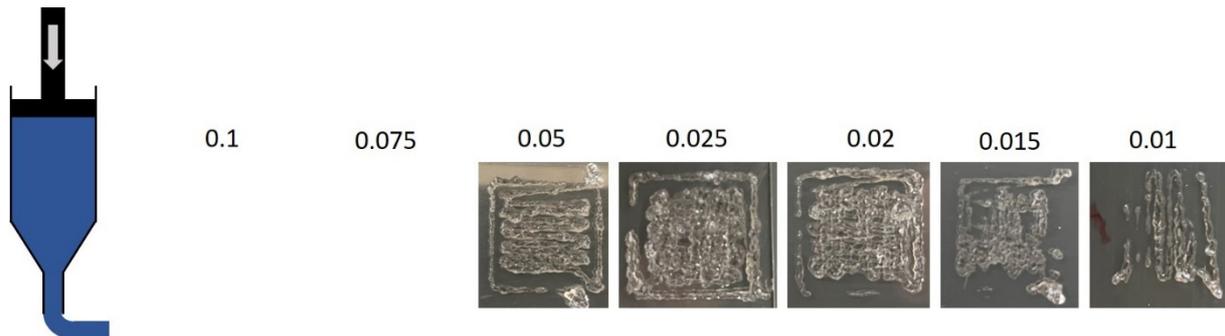


Abbildung 113: Bestimmung der optimalen Extrusionsgeschwindigkeit für GelNB/GelS Low bei einer Achsengeschwindigkeit von 10 mm/s durch eine konische Dosiernadel mit dem ID 250 µm.

9.2.3 Berechnung des Filamentdurchmessers

$$D [mm] = \sqrt{\frac{V}{4\pi}}$$

mit $V = \frac{V_{extrudiert}}{Strecke}$, $V_{extrudiert} = E [mm] * V_{Spritze}$, $E [mm] = \frac{E [\frac{mm}{s}] * Strecke}{F}$

$V_{Spritze} = 0,75 \mu\text{l/mm}$

9.3 Technische Zeichnung des MX-Systems

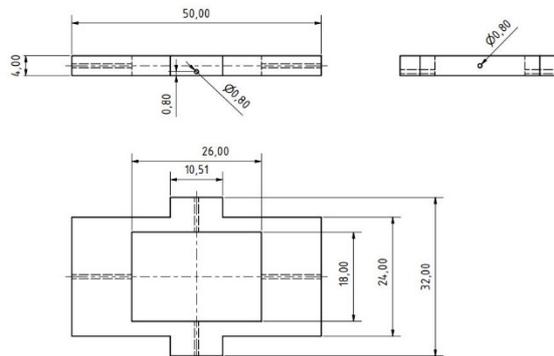


Abbildung 114: Technische Zeichnung des MX-Systems. Alle Angaben in mm. In Zusammenarbeit mit Michael Grün (Fakultät für Maschinenbau und Mechatronik, Hochschule Karlsruhe).

9.4 Tiefenfärbung von in Hydrogelen mit Vernetzer eingebetteten NHDF

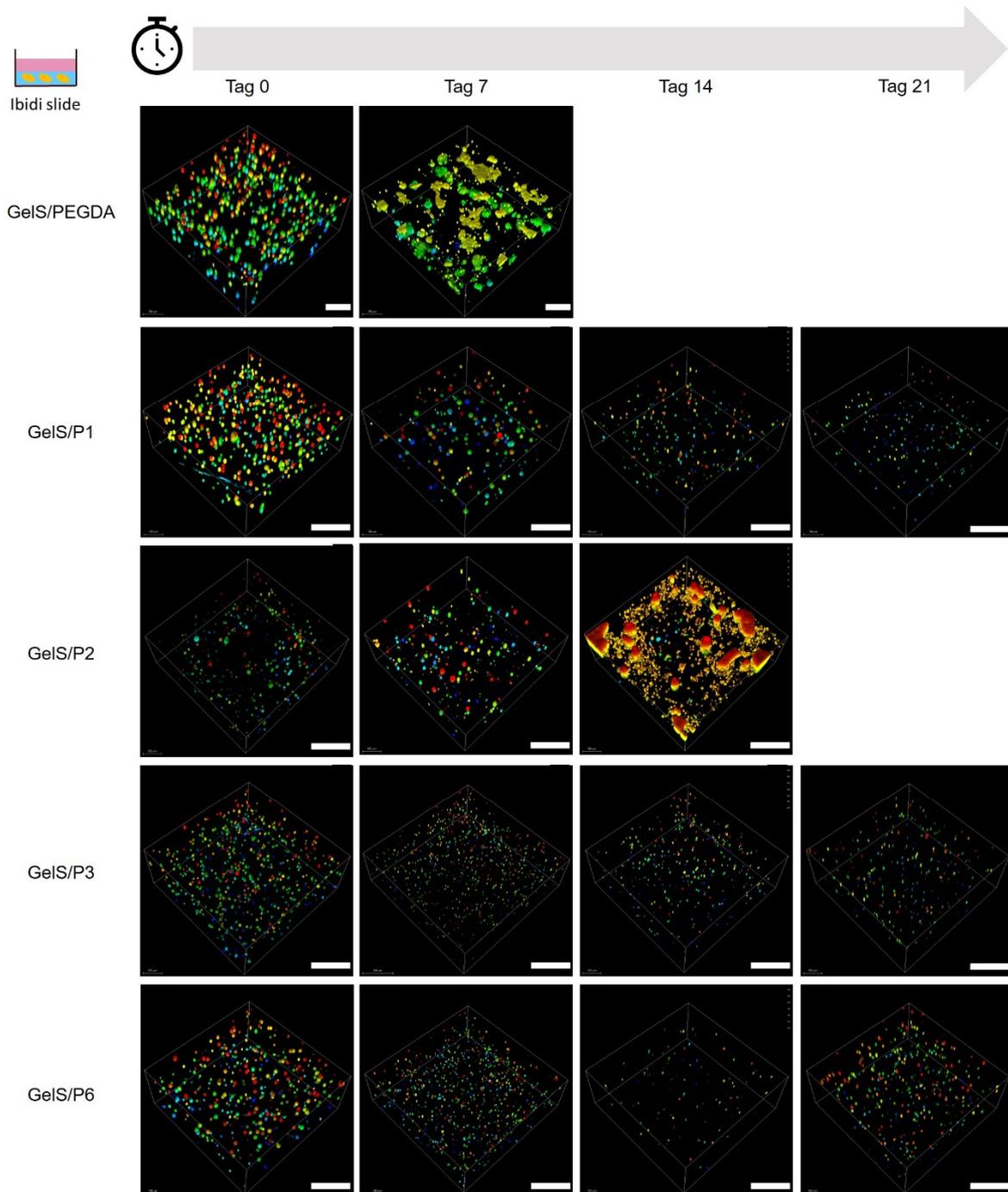


Abbildung 115: Tiefenfärbung von HepG2 in Hydrogelen mit Vernetzer. $2,5 \times 10^6$ HepG2/ml wurden in die Hydrogele eingekapselt und an Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 eine Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM und PI durchgeführt. Aus den aufgezeichneten Z-Stacks (Leica TCS SPE, 10x Objektiv, Z-Stack Höhe 300 μm , Schrittgröße 5 μm) wurde mit der Software Leica LasX die Tiefenfärbung erstellt. Blau: 0 μm , rot 300 μm . Maßstab 200 μm .

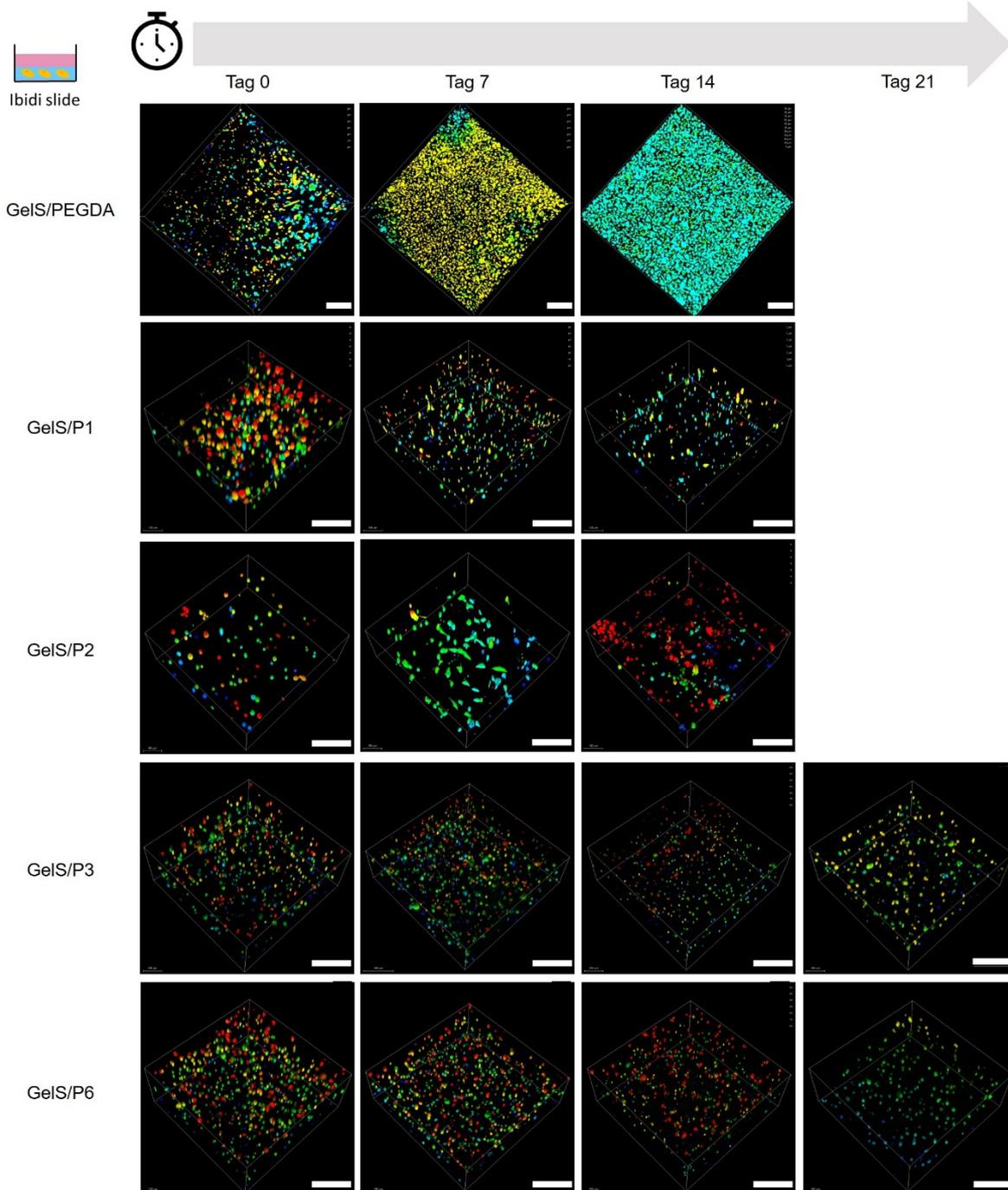


Abbildung 116: Tiefenfärbung von NHDF in Hydrogelen mit Vernetzer im μ -slide. $2,5 \times 10^6$ NHDF/ml wurden in die Hydrogele mit Vernetzer eingekapselt und an Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 eine Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM und PI durchgeführt. Aus den aufgezeichneten Z-Stacks (Leica TCS SPE, 10x Objektiv, Z-Stack Höhe 300 μ m, Schrittgröße 5 μ m) wurde mit der Software Leica LasX die Tiefenfärbung erstellt. Blau: 0 μ m, rot 300 μ m. Maßstab 200 μ m.

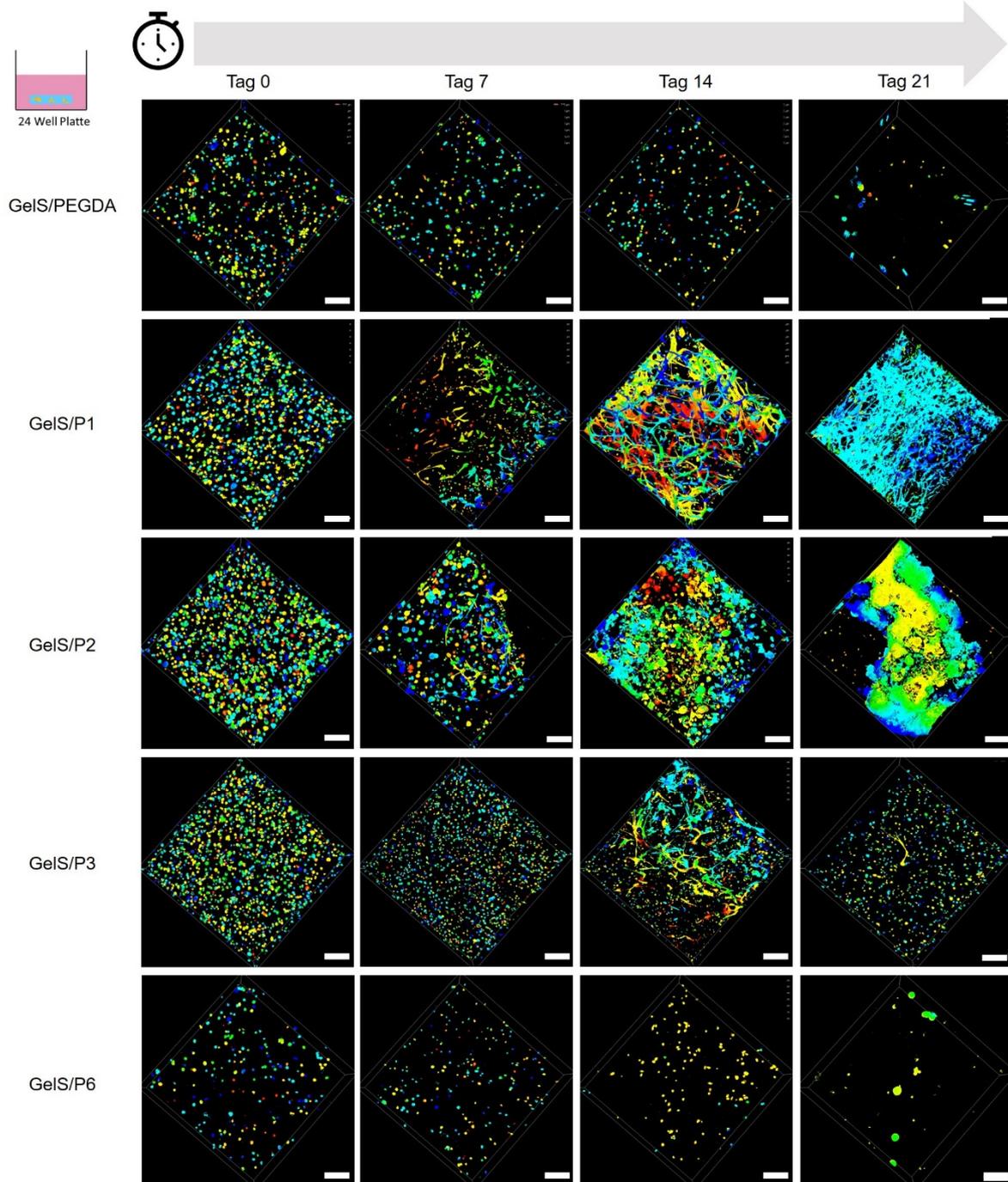


Abbildung 117: Tiefenfärbung von NHDF in Hydrogelen mit Vernetzer in der 24-Well Platte. $2,5 \times 10^6$ NHDF/ml wurden in die Hydrogele mit Vernetzer eingekapselt und an Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 eine Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM und PI durchgeführt. Aus den aufgezeichneten Z-Stacks (Leica TCS SPE, 10x Objektiv, Z-Stack Höhe $300 \mu\text{m}$, Schrittgröße $5 \mu\text{m}$) wurde mit der Software Leica LasX die Tiefenfärbung erstellt. Blau: $0 \mu\text{m}$, rot $300 \mu\text{m}$. Maßstab $200 \mu\text{m}$.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei *Prof. Dr. Ute Schepers* bedanken, dass sie mir dieses Projekt anvertraut hat und mir bei der Umsetzung freie Hand gelassen hat. Danke Ute, dass du mich immer fachlich und persönlich unterstützt hast und mich auch abseits der wissenschaftlichen Arbeit gefördert hast.

Frau *PD Dr. Beate Monika Köberle* danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Danke an den Arbeitskreis für die tolle Arbeitsatmosphäre, die fachlichen Diskussionen und die Unterstützung in allen Belangen. Ihr habt den Arbeitskreis während der gesamten Zeit zu einer besonderen Gruppe gemacht. Ich bin jeden Tag gerne zum Arbeiten ins Labor gekommen, weil ich wusste, ihr seid auch da. Danke *Hannah Buntz, Juliana Pfeiffer, Tamara Molitor* und *Nicole Pleschka*, für die Unterstützung bei den administrativen Aufgaben und den Spaß im Labor und Büro.

Meiner ehemaligen Masterstudentin und jetzt Kollegin und Freundin *Alisa Grimm* danke ich, dass du immer für mich da warst und besonders im letzten Jahr auch mal Teile des Projektes übernommen hast.

Sonja Leopold danke ich, dass sie immer eine Hand und ein Ohr frei hat, wenn Hilfe benötigt wird. Und für die spitzenmäßigen Kuchen bei jeder Gelegenheit. Einfach für die gemeinsame Zeit.

Michael Grün, danke für die tolle Zusammenarbeit über die gesamte Zeit, die wir uns kennen. Du hast immer Rat auf meine technischen Fragen gewusst und mir bei der Umsetzung der Druckprozesse hilfreich zur Seite gestanden. Danke für die unzähligen lustigen Mittagspausen, die vielen Kuchen (mit und ohne Gummibärchen) und dein offenes Ohr.

Für die gute Freundschaft, unzählige fachliche Diskussion und den Zusammenhalt vom Beginn des Studiums bis heute danke ich *Dominik Feser*. Du warst von Beginn an meiner Seite, als Kommilitone, Freund, Masterstudent, Kollege. Du hast mir den Alltag im Studium erleichtert, du hast immer an mich geglaubt und du hast den Laboralltag während der Promotion bereichert. Danke, dass ich mich immer an dich wenden kann, egal um was es geht. Auf dich ist immer Verlass, egal was ist, du bist da! Deine Zimtschnecken sind übrigens Legende.

Tobias Göckler, Sonja Haase und *Rebecca Pfister* danke ich, dass sie mich zu Beginn der Masterarbeit so herzlich im Arbeitskreis aufgenommen haben. Danke für die fachliche

Danksagung

Unterstützung zu jeder Zeit. Danke Tobi, für die Beantwortung aller noch so blöden Fragen, die flapsigen Bemerkungen und die gemeinsamen Laufrunden um den Campus. Danke Sonja, dass du mich für den 3D Biodruck begeistert und mir so viel beigebracht hast. Aus der Betreuerin der Masterarbeit wurde mit der Zeit eine sehr gute Freundin, auf die ich mich immer verlassen konnte und immernoch kann. Du weißt ja, „Kempter&Haase ...“. Die Trainingseinheiten mit dir waren immer mit Spaß verbunden, du warst die beste Trainerin. Rebecca, dir danke ich, dass du immer ein offenes Ohr für mich hattest und für die Motivation jeden Tag. Danke Sonja und Rebecca, dass wir das Administrationsteam im Arbeitskreis waren und uns gegenseitig die Arbeit erleichtert haben. Danke ihr beiden, für die Unmengen leckerer Plätzchen, die wir zusammen gebacken haben. Tobi, Sonja und Rebecca, wir waren ein Dream-Team im Labor (und außerhalb). Danke, dass ich ein Teil davon sein durfte (bin)!

Anna Meschkov, du warst und bist die gute Seele des Arbeitskreises. Danke dir, dass du immer für uns da bist, alles weißt und mich bei allem unterstützt hast. Mit dir war Spaß vorprogrammiert, auch in stressigen Zeiten.

Unserem Hilfswissenschaftler *Felix Mecklenburg* danke ich, dass du dich so eingehend mit dem Biodrucker beschäftigt hast, auch wenn die Drucktechnologie am Ende nicht mehr zum Einsatz kam. Meiner Masterstudentin *Johanna Wien* danke ich dafür, dass sie mich so sorgfältig bei der Umsetzung der noch fehlenden Experimente durch ihre Arbeit unterstützt hat.

Tobias Messer danke ich für die Unterstützung bei der Umsetzung des *direct laser writing* auch unter erschwerten Bedingungen. Danke Tobi, dass du dafür Zeit gefunden hast. Neben der wissenschaftlichen Unterstützung danke ich dir auch für die gemeinsame Zeit beim Retreat in Bad Herrenalb und für die Einführung in die Kunst des Mau-Mau-Spielens.

Für die Durchführung aller rheologischen Messungen und die Beantwortung aller dazugehörigen Fragen danke ich *Bruna Regina Maciel* vom Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik am KIT.

Den Projektpartnern im 3D BioNet danke ich für die vertrauensvolle Zusammenarbeit. Besonderer Dank geht an *Prof. Dr. Günther Finkenzeller* (Uniklinikum Freiburg), *Dr. Vadym Burchak* (Uniklinikum Freiburg) und *Fritz Koch* (Institut für Mikrosystemtechnik, Universität Freiburg) für die Nutzung des Hydrogels GelNB/GelS als Material für Knochen- und Knorpelersatzstrukturen.

Ein großer Dank geht an *Lutz Riegger* (Biofluidix GmbH), der auch außerhalb des 3D BioNet-Projektes stets für alle den Biodrucker BioSpot BP betreffenden Fragen eine Antwort gewusst hat.

Frank Kirschhöfer, dir danke ich für die Unterstützung bei der Trocknung unserer Materialien und für den fachlichen Rat bei der Massenspektrometrie.

Marvin Klaiber, danke, dass du dir die Zeit genommen hast, das Elektrojetting mit unseren Materialien zu testen. Danke für das Eis im Sommer und den Kaffee im Winter.

Den ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises *Christoph Grün, Vanessa Kappings, Eva Zittel* und *Ilona Wehl* danke ich für die Unterstützung zu Beginn meiner Promotion und die gute Zusammenarbeit.

Dem Exzellenzcluster „3D Matter Made to Order“ danke ich für die Finanzierung meines Projektes und die Möglichkeiten zur Teilnahme an außerfachlichen Kursen in der Graduiertenschule. Herr *Prof. Dr. Ulrich Lemmer* danke ich für die Teilnahme am Mentoring Committee und die hilfreichen Ratschläge. *Stefanie Peer*, danke für die tolle Organisation! *Thorana Grether*, danke für die Umsetzung des Bewerbungstrainings. Danke auch an alle nicht genannten, für die Organisation und Umsetzung aller Events im Cluster.

Dem *3D BioNet* danke ich für die Finanzierung der Anfänge meines Projektes.

Bei meinem Freund *Patrick* möchte ich mich dafür bedanken, dass er an meiner Seite ist. Patrick, du hast mich ertragen, wenn ich unerträglich war, du hast immer zu mir gehalten und mich ermutigt, wenn ich nicht mehr weiter wusste. Meinen Eltern *Bärbel* und *Steffen* danke ich, dass sie mir das Studium ermöglicht haben. Ihr habt mir damit einen Traum erfüllt, den ich wohl schon im Kindergarten gehegt habe. Danke Papa für das handwerkliche Geschick und das technische Verständnis, das hat mir meinen (Labor)Alltag oft erleichtert. Danke Mama, dass du so großen Wert auf meine Selbstständigkeit gelegt hast. Meinen Großeltern *Rosemarie* und *Dieter* danke ich, dass bei euch am Mittagstisch immer ein Platz frei ist, dass ihr immer Zeit für mich habt und immer auf mich aufpasst. Meiner gesamten Familie bin ich unglaublich dankbar für den Zusammenhalt und dass ich mich immer auf euch verlassen kann. *Steve*, dir danke ich für die langjährige Freundschaft und dass du immer dann da bist, wenn man dich braucht, egal um was es geht.

Danke!