

Aus der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten

Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde

der Universität Würzburg

Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll

**Untersuchung des zellbiologischen Verhaltens von Fibroblasten in modifizierten
Gelatine-Methacrylat basierten Harzen für den volumetrischen Biodruck**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Charlotte Marie Witteler

aus Wachenheim an der Weinstraße

Würzburg, April 2023



Referent: Prof. Dr. rer. nat. Uwe Gbureck
Korreferent: Prof. Dr. med. dent. Gabriel Krastl
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2023

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung der Arbeit	1
2	Wissenschaftlicher Kenntnisstand	3
2.1	Biofabrikation	3
2.2	Biotinten	4
2.2.1	Hydrogelbasis für Biotinten	5
2.2.2	Vernetzungsmechanismen	8
2.2.3	Bioharze	9
2.2.3.1	Photovernetzung	9
2.2.3.2	GelMA	11
2.3	3D-Biodruckverfahren	12
2.3.1	Herkömmliche Biodruckverfahren	12
2.3.2	Lichtbasierte Drucktechniken und volumetrischer Biodruck	14
2.4	Zellbiologische Untersuchung von Biotinten	19
2.4.1	Zellen	20
2.4.2	Methoden	21
3	Material und Methoden	26
3.1	Materialien	26
3.1.1	Technische Geräte und Hilfsmittel	26
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	30
3.1.3	Chemikalien und Kits	32
3.1.4	Zelllinien, Zellkulturmedien, -seren und -zusätze	35
3.1.5	Hydrogelkomponenten	37
3.1.6	Puffer und Lösungen	38
3.2	Methoden	39
3.2.1	Zellkultur	39
3.2.2	Herstellung der Hydrogele	39
3.2.2.1	Alginate-Gelatine-Hydrogele	39
3.2.2.2	GelMA-Hydrogele	40
3.2.3	Quantifizierung des zellulären Metabolismus – WST-8-Assay	42
3.2.4	Quantifizierung des zellulären DNA-Gehalts – PicoGreen-Assay	43
3.2.5	Beurteilung der zellulären Vitalität – Live/Dead-Assay	45
3.2.6	Bestimmung physikalischer und mechanischer Eigenschaften von GelMA-Hydrogelen	45
3.2.6.1	Quantifizierung der Quellung von GelMA-Hydrogelen	46

3.2.6.2	Bestimmung des E-Moduls der GelMA-Hydrogele	46
4	Ergebnisse	48
4.1	Vorversuche: Auswirkung der Seren BCS und FCS auf NIH-3T3-Zellen.....	48
4.1.1	NIH-3T3 in AlgGel-Hydrogelen	48
4.1.2	NIH-3T3-Zellen in GelMA-Hydrogelen	50
4.2	GelMA-Hydrogele: Auswirkung verschiedener <i>Batches</i> auf NIH-3T3-Zellen.....	53
4.3	Zellfreie GelMA-Hydrogele: Physikalische und mechanische Eigenschaften verschiedener GelMA-Konzentrationen	54
4.3.1	Quellung.....	54
4.3.2	E-Modul.....	55
4.4	GelMA-Hydrogele: Auswirkung verschiedener GelMA-Konzentrationen auf NIH-3T3-Zellen.....	56
4.5	GelMA: Auswirkung von Proteinzusätzen auf NIH-3T3-Zellen.....	63
4.5.1	Kollagen	63
4.5.2	Fibronectin	64
5	Diskussion.....	69
5.1	Vergleich des Einflusses der Seren FCS und BCS auf NIH-3T3-Zellen	69
5.2	Einfluss von GelMA-Modifikationen auf die Zytokompatibilität.....	70
5.3	Fazit und Ausblick	78
6	Zusammenfassung	80
7	Literaturverzeichnis.....	81
Appendix		87
I	Abkürzungsverzeichnis	87
II	Abbildungsverzeichnis	89
III	Tabellenverzeichnis	91
IV	Anhang.....	92
V	Danksagung.....	95

1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

Im Dezember 2019 erkrankten in Wuhan (China) mehrere Patienten an einer Pneumonie unbekannter Herkunft. [1] Der als SARS-CoV-2 identifizierte Erreger führt innerhalb weniger Wochen zu einer weltweiten Pandemie, da es an geeigneten Medikamenten und Impfstoffen fehlt, um die Virusinfektion suffizient einzudämmen. [2] Exemplarisch zeigt die COVID-19 Pandemie, dass eine Notwendigkeit für die Beschleunigung von Prozessen, die der Therapie und Prävention neuartiger Erkrankungen dienen, besteht. Die konventionelle Herstellung eines Medikaments benötigt Jahre bis Jahrzehnte. Dabei werden in der präklinischen Herstellungsstufe Versuche an Tieren oder humanen Zellkulturen durchgeführt. Die Ungenauigkeit dieser Versuche führt dazu, dass im klinischen Stadium viele Medikamente wieder ausgeschlossen werden, da sich die erprobte Wirkung von der auf den Menschen unterscheidet. [3] Lösung des Problems könnte der Einsatz von *in-vitro*-Gewebe-modellen sein, die sich mit 3D-Biodruckverfahren herstellen lassen. So wurde in den letzten Jahren u.a. von winzigen Haut-, Leber- und Atemwegsmodellen berichtet, die auf diesem Weg generiert wurden. [4-6] Gedruckte Gewebemodelle könnten so eine sinnvolle Möglichkeit darstellen, in kürzester Zeit Krankheiten *in vitro* zu simulieren und anhand dessen die pathogenen Mechanismen nachzuvollziehen sowie Therapiemöglichkeiten und Medikamente zu bewerten. Tierversuche lassen sich auf diesem Weg vermeiden und der komplexe Aufbau humaner Gewebe wird exakter repliziert, wodurch eine bessere Übertragbarkeit auf den Menschen gewährleistet wird. [7] Jedoch stehen diese Ansätze noch am Anfang ihrer Entwicklung, weshalb zukünftig mehr Zeit in die Forschung an geeigneten Druckverfahren und Zell-Trägersubstanzen, sogenannten Biotinten, investiert werden sollte. Eine vielversprechende Technik für den Druck von Gewebemodellen ist die des volumetrischen Biodrucks (VB). Er stellt eine Unterkategorie der *vat polymerization* dar, bei welchem die fotoaktive Biotinte, hier Bioharz genannt, in einem Behälter gelagert und selektiv mit Licht vernetzt wird. [8] *Vat polymerization* verzichtet im Gegensatz zu anderen Biodruckverfahren auf den Einsatz von Düsen, wodurch das Zellüberleben gesteigert und der Druck komplexer Strukturen ermöglicht wird. [9, 10] Weiterhin hebt sich der VB von anderen Druckverfahren besonders ab, da durch die simultane Vernetzung des Bioharzes im Behälter sehr kurze Herstellungszeiten der Biokonstrukte erzielt werden. [8, 11] Leider besteht für *vat polymerization*-Techniken bis heute ein Mangel an geeigneten Bioharzen. [8] Daher beschäftigt sich vorliegende Arbeit mit dem Bioharz Gelatine-Methacrylat (GelMA), das für *vat polymerization*-Techniken und insbesondere den vielversprechenden VB verwendet werden kann. Es

wurden zylinderförmige GelMA-Hydrogele, beladen mit NIH-3T3-Zellen, gegossen und kultiviert, um die Wirkung druckgeeigneter Materialien in einem einfachen Modell mit Zellen zu testen. Vorteile der druckfreien Vorversuche im Vergleich zum VB waren deren schnelle Durchführbarkeit und ihr geringerer Bedarf an Bioharz. Der Hypothese folgend, dass eine Veränderung der Zusammensetzung eines GelMA-Hydrogels die Zellverträglichkeit verbessert, wurden folgende Fragestellungen genauer untersucht:

- Wie wirken sich unterschiedliche GelMA-Molekulargewichte auf die Zytokompatibilität aus?
- Wie verändert sich die Steifigkeit eines GelMA-Hydrogels mit abnehmender GelMA-Polymerkonzentration?
- Wie wirken sich unterschiedliche GelMA-Polymerkonzentrationen auf die Zytokompatibilität aus?
- Beeinflusst der Zusatz adhäsionsvermittelnder Proteine in GelMA-Hydrogelen die Zytokompatibilität?

Für die zellbiologische Bewertung der unterschiedlichen Konstrukte wurden Fibroblasten, die in den GelMA-Hydrogelen kultiviert wurden, anhand des DNA-Gehalts, des Metabolismus und der Zellvitalität charakterisiert. Die mechanische Beurteilung der Hydrogele erfolgte anhand der Messung ihres E-Moduls sowie der Beobachtung ihres physikalischen Quellverhaltens.

2 Wissenschaftlicher Kenntnisstand

2.1 Biofabrikation

Im Allgemeinen steht der Terminus Biofabrikation für einen automatisierten Prozess, welcher ein definiertes Produkt mit biologischer Funktion hervorbringt. Die Biofabrikation überlappt sich teilweise mit den Forschungsgebieten des *tissue engineering* (TE) und der *regenerative medicine* (RM). [12] RM ist definiert als die Nutzung von TE und anderen Gewebewissenschaften, die der strukturellen und funktionellen Wiederherstellung von Organen und Geweben dienen. Dies kann *in vivo* oder *in vitro* geschehen. [12, 13] Neben der Herstellung funktionaler Gewebeanaloga für den Menschen, ist auch die Synthese von Gewebemodellen, die in der pharmazeutischen Industrie Anwendung finden, ein wichtiger Zweck der RM. TE ist ein Teilgebiet der RM, welches die Anwendung physikalischer, chemischer, biologischer und technischer Prozesse beschreibt, die eine Zellaggregation steuern. [12] Im Unterschied zur RM beschränkt sich die Gewebeherstellung im TE jedoch auf *in vitro* Verfahren. [13] Neben vielen unterschiedlichen Möglichkeiten der Gewebeherstellung im TE und der RM, beschreiben die beiden biofabrikationstechnischen Ansätze den Biodruck und die Bioassemblierung, die zum Großteil auf additiven Fertigungsweisen basieren (siehe Abbildung 1). Beide beschreiben computergestützte Verfahren zur automatisierten Herstellung definierter Konstrukte, die eine zwei- oder dreidimensionale Struktur besitzen und im Anschluss an die Produktion eine Gewebereifung durchlaufen. [12] Jedoch besteht der Unterschied darin, dass der Biodruck sich hierfür lebender und nicht-lebender Materialien bedient, die druckbar sind. [14] Hingegen verwendet die Bioassemblierung vorgefertigte Zell-Bausteine, welche sich nicht drucken lassen. [12]

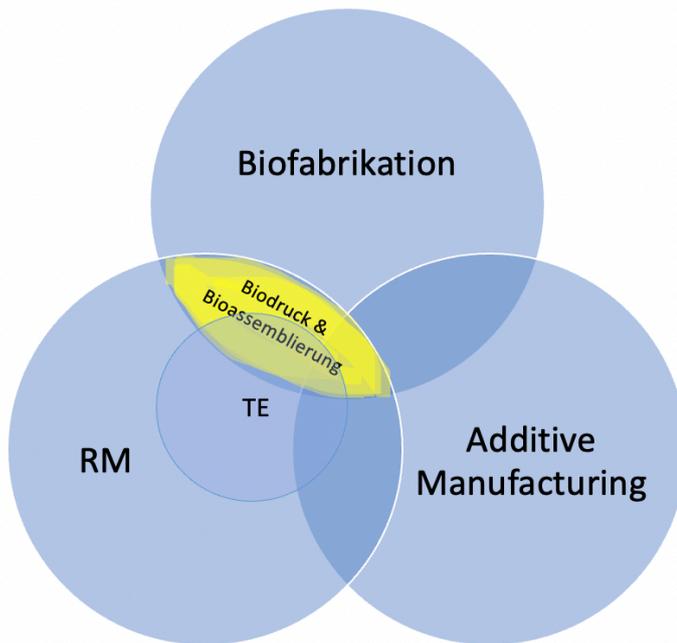


Abbildung 1: Venn Diagramm zeigt Überschneidung von Biofabrikation, RM (regenerative medicine), TE (tissue engineering) und Additive Manufacturing. Die biofabrikationstechnischen Ansätze der RM (mit dem Teilgebiet des TE) sind der Biodruck und die Bioassemblierung. Sie beruhen hauptsächlich auf additiven Verfahren. Die Größe der Kreise und Überlappungen entsprechen nicht der Größe der Forschungsfelder. Eigene Darstellung.

2.2 Biotinten

Im Jahr 2018 haben Groll *et al.* eine Definition für den Terminus Biotinten vorgeschlagen: Biotinten sind Formulierungen aus Zellen, welche sich mittels automatisierter Biofabrikationstechnologien prozessieren lassen. Sie können, müssen aber nicht, weitere bioaktive Zusätze und Biomaterialien enthalten. [15] Unter Zellformulierungen werden z.B. einzelne Zellen, aggregierte Zellen in Form von Sphäroiden, Zellen strukturiert in Organoiden oder Zellen in kolloidalen Mikroumgebungen verstanden, wobei noch viele weitere Varianten existieren. Der optionale Einsatz von Additiven, wie bspw. bioaktiven Wachstumsfaktoren, Zytokinen oder Desoxyribonukleinsäure (DNA) sowie der Zusatz weiterer Biomaterialien führt zu einer Bandbreite an Modifikationen. Die Definition ist losgelöst von möglichen Einsatzgebieten worunter u.a. der Druck von Zellen, Gewebe und Organen sowie die Produktion von *organ-on-a-chip* oder *in vitro* Modellen zählen, sofern sich diese der Biofabrikation zurechnen lassen. Sie ist ebenfalls unabhängig von der angewandten Drucktechnik, wie dem Tintenstrahldruck oder lichtbasierten Verfahren. [15] Die meisten Biotinten enthalten Zusätze in Form von Hydrogel-Vorläufern,

welche sich aus synthetischen oder natürlichen Polymeren zusammensetzen. Diese werden zu Hydrogelen vernetzt, die einen hohen Wasseranteil aufweisen. [16] Abhängig vom Einsatzgebiet und der Biofabrikationstechnologie werden Hydrogel-Vorläufer herangezogen, um die Biotinten druckbar zu machen. So muss bspw. eine Biotinte in lichtbasierten Drucktechniken photovernetzbar sein. [17] Dies lässt sich durch transparente Hydrogele und den Zusatz von Photoinitiatoren erreichen.

Von den Biotinten werden die Biomaterialtinten abgegrenzt, welche sich durch Zellfreiheit auszeichnen. Würden diesen Formulierungen Zellen zugesetzt, entstünden Biotinten. So lassen sich aus Biomaterialtinten bspw. Gerüstträger drucken, auf welche im Anschluss die Aussaat von Zellen erfolgt. Auch der Druck von Implantaten erfolgt durch den Einsatz von Biomaterialtinten. [15]

2.2.1 Hydrogelbasis für Biotinten

Die meisten Biotinten basieren auf Hydrogel-Vorläufern, welche zu Hydrogelen vernetzt werden. Dies erfolgt meist im Anschluss an den Druckprozess. [15, 18] Hydrogele besitzen einen hohen Wasseranteil, da sie dank hydrophiler Polymere in Wasser um das Vielfache ihrer eigentlichen Masse anschwellen, ohne sich dabei aufzulösen. [16, 19, 20] Hydrogele als Basis für Biotinten müssen verschiedene Anforderungen erfüllen: Zunächst müssen sie den Zellen eine dreidimensionale Stützstruktur während der Kultivierung bieten. [17] Es ist jedoch wichtig, dass die Hydrogele zugleich degradierbar sind, damit Zellen proliferieren und neues Gewebe bilden können. Zudem sollte die Abbaurate hier variabel sein, damit sich diese mit dem individuellen Gewebewachstum in Einklang befindet. Zweitens müssen Hydrogele zytokompatibel sein, damit den eingebetteten Zellen eine Umgebung geboten wird, in welcher Proliferation und Differenzierung möglich sind, denn nur so können Zellen ihre Bestimmung erfüllen. [21] Die Zytokompatibilität basiert auf verschiedenen Hydrogel-Eigenschaften: Sie wird u.a. durch eine gewebeähnliche Elastizität und gute Diffusionskapazitäten erreicht, welche denen der Extrazellulärmatrix (EZM), der Umgebungsstruktur von Zellen *in vivo*, ähneln sollen. [22] Zuletzt sollen Hydrogele eine instruktive Rolle auf die Zellen ausüben, welche *in vivo* die EZM übernimmt, um die grundlegenden Zellfunktionen, wie Adhäsion, Migration, Differenzierung und Proliferation *in vitro* zu unterstützen. [21, 23] Die Adhäsion wird bei Zellen bspw. über membranständige Integrine vermittelt, welche mit integrinbindenden Motiven der EZM, z.B. mit Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD)-Sequenzen, eine Bindung eingehen. [19, 21] Daher sollten bestenfalls Hydrogelkomponenten herangezogen werden,

welche bereits integrinbindende Ankersequenzen besitzen, wie bspw. die Gelatine. [21] Es ist jedoch auch möglich, das Hydrogel mit Additiven auszustatten, um dessen zellbiologische Aktivität zu steigern. Dafür lassen sich Proteine und Peptide verwenden, die in das Hydrogel integriert werden. Besteht bspw. Bedarf an zelladhäsiven Proteinen, welche RGD-Sequenzen enthalten, können Kollagen, Fibronectin, Laminin oder Osteopontin verwendet werden. [22, 24] Kollagen ist ein sehr wichtiges, strukturbildendes Protein im menschlichen Körper, welches aus je drei Polypeptiden besteht, die sich in Form einer sogenannten „Tripelhelix“ umeinanderwinden. Wird das Protein auseinandergelassen – denaturiert – entsteht Gelatine. [25] Fibronectin ist ein Glykoprotein, das aus zwei Polypeptidketten besteht. Diese sind aus sich wiederholenden Einheiten von Aminosäuren aufgebaut, in denen sich Domänen befinden, die wiederum an andere Moleküle binden können, wie bspw. an Kollagen, Fibrin oder an Integrine. [26]

Die genannten Anforderungen sollte jedes Hydrogel erfüllen, welches als Biotintebasis verwendet wird. Weitere Hydrogel-Eigenschaften können in Abhängigkeit vom gewünschten Einsatzgebiet oder Druckverfahren variieren. Vernetzungsdichte und Porengröße sind dabei in der Lage, viele Parameter zu modifizieren, z.B. den Wasseranteil oder mechanische Faktoren. [22] Die Hydrogelbasis von Biotinten kann natürlicher, synthetischer oder kombinierter Herkunft sein; sie werden wie folgt beschrieben:

Natürliche Polymere

Zu den Hydrogelen natürlicher Herkunft zählen bspw. Alginat, Gelatine und Hyaluronsäure. [16, 27] Sie enthalten Polymere natürlicher Herkunft, meist Polysaccharide, aber auch Peptide oder Proteine, welche bei Bedarf synthetisch modifiziert werden können. [16] Sie sind meist kostengünstig und in großen Mengen vorhanden. [27] Weiterhin beeinflussen sie oft die Zell-Vitalität und -Proliferation positiv durch inhärente Signalmoleküle. [22] Die genannten Vorteile führen zu einer häufigen Anwendung der natürlichen Polymere. Ein großer Nachteil sind hingegen die signifikanten *batch-to-batch* Variationen, welche zwischen einzelnen Chargen auftreten, da so die Einflussnahme auf Zellen variiert und die Reproduktion von Versuchen erschwert werden kann. [22, 27]

Die oft verwendete Gelatine ist ein Polypeptid, welches durch Hydrolyse aus Kollagen gewonnen wird. [16] Sie ist biologisch abbaubar und enthält zelladhäsive Sequenzen. [18] Gelatine kann auf verschiedene Weisen vernetzt werden; chemisch, physikalisch oder durch den Zusatz weiterer Komponenten. Wird die Netzwerkbildung enzymatisch mittels Transglutaminase hervorgerufen, entstehen stabile, kovalente Bindungen,

weshalb diese Art der Vernetzung den chemischen Vernetzungen zugerechnet werden kann. [28, 29] Die thermoreversible Gelierung ist hingegen physikalischer Art. [18, 30] Wenn die Gelatine ihre Sol-Gel-Übergangstemperatur im Bereich von 25 bis 30 °C unterschreitet, geliert sie. [20] Dieser Effekt wird nach Anheben der Temperatur wieder umgekehrt. [18] Da Zellexperimente bei 37 °C stattfinden und gelatine-basierte Hydrogele potenziell auch am Menschen angewandt werden sollen, ist eine Stabilisierung dieser Hydrogele nötig. Alternativ zur enzymvermittelten Vernetzung stellt die Modifikation von Gelatine mit funktionellen Gruppen eine weitere chemische Option zur Vernetzung dar. [31] Hier ist GelMA weit verbreitet. [8, 31] Aber auch die Funktionalisierungen mit Allylgruppen, wie Gelatine-Allylglycidylether (GelAGE), Norbornenen und vielen weiteren funktionellen Gruppen finden in der Wissenschaft Anwendung. [18, 31, 32] Auch die Stabilisierung der Gelatine durch Zusätze ist populär. Oft wird dabei Alginat als stabilisierende Komponente eingesetzt, da die Vernetzung unter milden Bedingungen (physiologischer pH, Raumtemperatur) abläuft. [33] Alginat ist ein Polysaccharid aus Algen und biologisch inert, enthält also bspw. keine zelladhäsiven Sequenzen. [16, 18] Hingegen ist es kostengünstig, breit verfügbar und lässt sich physikalisch vernetzen. [16] Die Vernetzung basiert auf der ionischen Gelierung des Alginats mit zweiwertigen Kationen (z.B. Ca^{2+}), sodass ein stabiles Gel, z.B. ein Calcium-Alginat-Hydrogel, entsteht. [18, 33] Die Kombination Alginat-Gelatine (AlgGel) vereint somit Vorteile beider natürlichen Polymere miteinander, um stabile, zytokompatible Hydrogele zu bilden. So wenden Wüst *et al.* 2014 AlgGel im Extrusionsdruck an. [34] Sie nutzen einerseits die reversible Gelierung der Gelatine, indem warme, flüssige AlgGel durch einen erhitzten Spritzenkopf geführt wird, wobei die Extrusion des Gels auf einen gekühlten Träger zu einer sofortigen Gelierung führt, welche das Gelkonstrukt stabilisiert. Im zweiten Schritt wird das Potenzial des Alginats genutzt, indem das Konstrukt durch Zugabe von CaCl_2 geliert. [34] So bleibt es auch bei Temperaturen von 37 °C stabil, bis eine Degradation eintritt.

Synthetische Polymere

Der Vorteil synthetischer Polymere ist vor allem die präzise Kontrolle chemischer und physikalischer Eigenschaften durch definierbare Modifikationen, welche zu niedrigen Variationen zwischen *Batches* und somit einer besseren Reproduktion führt. [16, 27] Polyethylenglycol (PEG) und Polyacrylamid sind zwei bekannte Vertreter dieser Gruppe, wobei PEG in der Biofabrikation das am meisten genutzte synthetische Hydrogel ist. Es wird chemisch oft mit Acrylatgruppen modifiziert, um es photovernetzbar zu machen, denn Polyethylenglycol Diacrylat (PEGDA) eignet sich gut für die Einkapselung von

Zellen. [16] Da synthetische Hydrogele in reiner Form biologisch inert sind, müssen Ankerpunkte in diese eingebaut werden, um Zellen eine Adhäsionsmöglichkeit zu bieten. Dafür lassen sich z.B. RGD-Sequenzen oder adhäsive Proteine wie Fibronectin verwenden. [8, 35, 36] Es wurde gezeigt, dass PEGDA funktionalisiert mit RGD-Sequenzen die Zelladhäsion und Proliferation unterstützt. [37]

2.2.2 Vernetzungsmechanismen

Die Vernetzung eines Hydrogels kann chemischer oder physikalischer Art sein, wobei auch verschiedene Mechanismen miteinander kombiniert werden können. Bei der chemischen Vernetzung kommt es zur Ausbildung kovalenter Bindungen, wohingegen die physikalische Vernetzungsreaktion reversibler Art ist. [30]

Physikalische Vernetzung

Physikalische Vernetzungen sind nicht-kovalente Bindungen, welche Gele vor direkter Auflösung in wässriger Umgebung schützen. Vorteilhaft ist die gute Zytokompatibilität wegen nicht vorhandener toxischer Reagenzien, die in einigen chemischen Vernetzungsreaktionen auftreten. Einen bedeutenden Nachteil stellt jedoch die oft niedrige mechanische Stabilität physikalisch vernetzter Gele dar, welche eine chemische Nachvernetzung nötig macht, um eine Auflösung dieser zu verhindern. Es werden unterschiedliche Arten der physikalischen Vernetzung unterschieden: ionisch, thermisch oder stereokomplex. [30] Wie bereits unter 2.2.1 am Beispiel des Alginats beschrieben, kommt es bei der ionischen Stabilisierung zu einem Ionenaustausch. [18, 33] Die thermische Stabilisierung thermosensitiver Polymere führt zu einer temperaturabhängigen Gelierung, wie unter 2.2.1 am Beispiel der Gelatine erklärt und die stereokomplexe Vernetzung wird durch Oligomere gegensätzlicher Chiralität vermittelt. [18, 30]

Chemische Vernetzung

Bei der chemischen Vernetzung werden kovalente Bindungen gebildet, wodurch ein mechanisch stabiles Netzwerk entsteht. Daher erfolgt diese Art der Vernetzung hauptsächlich im Anschluss an die Prozessierung herkömmlicher Druckverfahren oder zur Stabilisierung physikalisch vernetzter Konstrukte, bei welchen nur ein initialer Formerhalt gewährleistet ist. Ausgangsmaterialien sind Monomer- oder Polymerlösungen mit Initiatoren oder komplementäre reaktive Hydrogel-Vorläufer, welche durch Bestrahlung oder Reaktion komplementärer chemischer Gruppen vernetzt werden. [30] Im Bereich kovalenter Bindungen, die häufig in der Biofabrikation zum Einsatz kommen, wären

beispielhaft enzymatische Reaktionen, Thiol-ene Klick Reaktionen und Michael-Additions-Reaktionen zu nennen. [29, 30, 38] Bei der Bestrahlung interagiert UV- oder sichtbares Licht mit dem Photoinitiator, welcher sich in der unvernetzten Hydrogel-Suspension befindet. Dabei entstehen Radikale, welche die Polymerisation initiieren. [21] Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass das UV-Licht einen negativen Einfluss auf die eingebetteten Zellen haben kann. [30] So lässt sich z.B. GelMA, welches mit dem Photoinitiator Irgacure 2959 versetzt ist, drucken. Es wird zunächst in flüssigem Zustand durch einen auf 37 °C erwärmten Spenderkopf auf eine gekühlte Empfängerplatte extrudiert, was zu einer initialen physikalischen Stabilisierung des Hydrogels führt. Im zweiten Schritt kommt der Photoinitiator zum Einsatz; das Gel wird mit UV-Licht bestrahlt und es bilden sich Radikale, welche die Polymerisation initiieren und das Netzwerk chemisch nachvernetzen. [39]

2.2.3 Bioharze

Bioharze stellen eine Untergruppe der Biotinten dar. Sie werden als Zellformulierungen definiert, welche sich mit automatisierten lichtbasierten Biofabrikationstechnologien prozessieren lassen. [15] Damit sind Bioharze zellbeladene Präpolymerlösungen, welche zusätzlich Photoinitiatoren enthalten, damit eine Photopolymerisation ermöglicht wird. [9] Das Bioharz befindet sich meist in einem Behälter, der selektiv bestrahlt wird. Diese Verfahren werden unter dem Begriff *vat polymerization* zusammengefasst. Dabei gibt es grundsätzlich viele unterschiedliche Arten lichtbasierter Drucktechniken, wobei die Bestrahlung des Harzes - punktwise, schichtweise oder komplett - einen der Hauptunterschiede darstellt. [9]

2.2.3.1 Photovernetzung

Die Photovernetzung der Präpolymerlösung wird durch die Bestrahlung eingeleitet, wobei meist UV- oder sichtbares Licht genutzt wird. [17] Die zwei gebräuchlichsten Typen der Photovernetzung in lichtunterstützten Biodruckverfahren sind die Ketten- und Stufenpolymerisation. [8] Biotinten, die Acryloyl- oder Vinyl-Gruppen besitzen, bspw. GelMA und PEGDA, werden mittels Kettenpolymerisation vernetzt. [17, 18] Die Verknüpfung wird durch Radikale initiiert, welche bei definierter Wellenlänge aus Photoinitiatoren gespalten werden. Die Radikale bilden mit funktionellen Gruppen der Hydrogelvorläufer kovalente Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen. Es kommt zur Entstehung mehrerer aktiver Zentren, an denen weitere Vernetzungen möglich sind. [8, 18] Die Kettenpolymerisation zeichnet sich durch die Bildung stabiler Gele sowie eine einfache

Durchführung aus, da keine zusätzlichen Vernetzer benötigt werden, wie bei der Stufenpolymerisation. Andererseits geht sie mit einer Anfälligkeit gegenüber Sauerstoff einher, welche in einer unvollständigen Vernetzung resultieren kann. Weiterhin wird von hohen initialen Radikalkonzentrationen berichtet, welche potenziell zytotoxisch sein können. Zuletzt bildet die Kettenpolymerisation heterogene Netzwerke, welche die Kontrolle über mechanische Eigenschaften und Degradierungsprofile vermindert. [18, 32] GelAGE und Gelatine-Norbornen sind Beispiele für Hydrogelsysteme, welche mittels Stufenpolymerisation vernetzt werden. [11, 31] Der populärste Reaktionstyp der Stufenpolymerisation ist die Thiol-ene Klick Reaktion. Er ist gekennzeichnet durch gezielte Dimerisierung einer C-C-Doppelbindung mit einer Thiolgruppe. [8, 27, 31] So reagieren bspw. die Alkengruppen von GelAGE mit Thiolgruppen. Diese Thiolgruppen werden radikalisch von einem beigesetzten Vernetzer, wie bspw. Dithiothreitol, abgespalten. [8, 18, 32] Wie bei der Kettenpolymerisation entstehen die Radikale wiederum durch Spaltung angeregter Photoinitiatoren. [8] Die Benötigung eines Vernetzers macht die Thiol-ene Klick Stufenpolymerisation komplizierter. Von Vorteil ist hingegen die Schnelligkeit des Verfahrens, die Homogenität der Netzwerke, der niedrigere Anteil benötigter Radikale für die Initiierung der Polymerisation und die Unempfindlichkeit gegenüber Sauerstoff. [18, 32]

Photoinitiatoren

Die Initiierung der Photovernetzung erfordert den Einsatz von Photoinitiatoren. UV- oder sichtbares Licht regen die Photoinitiatoren an, welche infolgedessen in einen kurzweiligen Triplett-Zustand überführt werden, welcher mit der Bildung zweier Radikale endet. Diese initiieren wiederum die Polymerisation. Es existieren zwei Typen von Photoinitiatoren, welche sich in Absorptionsprofil, Wasserlöslichkeit, Zytokompatibilität und Initiationsmechanismus unterscheiden. Typ 1 Photoinitiatoren, zu welchen Irgacure 2959 und Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat (LAP) zählen, erfahren bei der *vat polymerization* die häufigste Anwendung, da sie sehr effizient sind. [8, 17, 21] Ein großer Vorteil von LAP gegenüber Irgacure 2959 ist die Form der Anregung. LAP kann sowohl mit sichtbarem Licht (405 nm) als auch mit UV-Licht (365 nm) in den kurzweiligen Triplett-Zustand überführt werden, wodurch die Zytokompatibilität gesteigert wird. [8, 17, 40] Außerdem ist LAP besser wasserlöslich und führt zu einer höheren Polymerisationsrate, weshalb es Irgacure 2959 gegenüber inzwischen bevorzugt wird. [40] Biomolekulare Typ 2 Photoinitiatoren, wie z.B. Eosin Y, benutzen einen komplexeren Initiationsmechanismus, der zudem weniger effizient ist. Daher werden sie nur noch selten angewendet. [21]

2.2.3.2 GelMA

Das in dieser Arbeit verwendete Bioharz GelMA gehört zu den etablierten Hydrogelsystemen und wurde zuerst 2000 von Van Den Bulcke *et al.* beschrieben. [20] Die Synthese des GelMA-Präpolymerisates geschieht wie folgt: Gelatine wird in Phosphatpuffer (pH 7,5) bei 50 °C gelöst und im Anschluss daran Methacrylsäureanhydrid zur Reaktion beider hinzugegeben, sodass Methacrylatgruppen an den freien Amino- und Hydroxylgruppen entstehen (siehe Abbildung 2 A). Die Mischung wird nach einer Reaktionszeit von 1 h verdünnt und anschließend für 24 h dialysiert. Zuletzt wird das Reaktionsprodukt lyophilisiert, wobei ein weißer Feststoff entsteht. [19, 20] Der Syntheseprozess lässt einige Variationsmöglichkeiten zu, wie z.B. die Anpassung des Methacrylisierungsgrades, welcher mechanische Eigenschaften beeinflusst. Wird das Hydrogel bspw. höher funktionalisiert, wird die Degradierung verlangsamt und die Quellung nimmt ab. [19, 41] GelMA ist semi-synthetisch und basiert auf dem natürlichen Protein Gelatine, dem Hydrolyseprodukt von Kollagen, welches wiederum Hauptbestandteil der EZM ist. Die Gelatine stättet die Biotinte mit zelladhäsiven Sequenzen aus und führt dazu, dass sie sich degradieren lässt. [18, 19, 42] Das physikalische Netzwerk der gelierten Gelatine ist eine partielle Wiederausbildung der Kollagen-Tripelhelix, welche bei Überschreitung der Gel-Sol-Übergangstemperatur erneut destruiert wird. Um jedoch die Stabilität der Biotinte bei Erwärmung zu erhalten, wird sie methacryliert und mit Photoinitiatoren ausgestattet. So kann GelMA photopolymerisiert werden und erhält durch kovalente Bindungen ein dauerhaft stabiles Netzwerk (siehe Abbildung 2 B). [20] Neben der Anpassung des Funktionalisierungsgrades bieten sich auch während der eigentlichen Hydrogel-Herstellung Modifikationsmöglichkeiten, um mechanische Parameter zu beeinflussen. So lässt sich die GelMA-Konzentration der Gele variieren, oder auch die Photopolymerisation, indem Bestrahlungsdauer, Lichtintensität und Initiatormenge angepasst werden. [41]

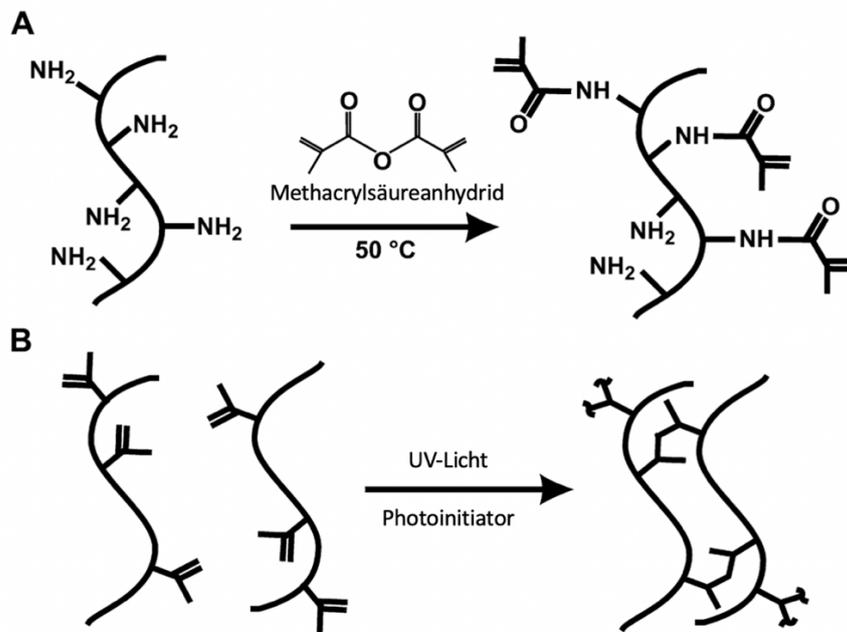


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Synthese und Vernetzung von GelMA (Gelatine-Methacrylat). Gelatine reagiert mit Methacrylsäureanhydrid bei $50\text{ }^\circ\text{C}$ zu GelMA (A). Durch die Photopolymerisation des GelMA-Hydrogelvorläufers entsteht ein GelMA-Hydrogel (B). Bild modifiziert nach Nichol et al. [43]. Mit Genehmigung von PERGAMON, Biomaterials, 2010. Lizenz 1290261-1.

2.3 3D-Biodruckverfahren

Im Bereich der Biofabrikation, welcher sich den Gebieten TE und RM widmet, stellt der Biodruck eine Methode dar, die der Herstellung und Regeneration von Gewebe dient, aber auch in zellbiologischen Studien oder in der Modellierung menschlicher Organe genutzt wird, um daran Pharmazeutika zu testen oder Krankheiten zu simulieren und zu verstehen. [6, 12, 44] Nach Guillemot *et al.* 2010 wird der Biodruck als computerunterstütztes, automatisiertes Verfahren definiert, welches festgelegte 2D und 3D Strukturen aus vitalen und avitalen Materialien zusammensetzt. [14] Es gibt verschiedene Verfahren des Biodrucks, welche in dieser Arbeit in herkömmliche und lichtbasierte Techniken unterschieden werden.

2.3.1 Herkömmliche Biodruckverfahren

Nachfolgend werden zwei gebräuchliche Arten der herkömmlichen Biodruck-Verfahren beschrieben; der Tintenstrahldruck und der Extrusionsdruck.

Tintenstrahldruck

Der Tintenstrahldruck, in englischen Veröffentlichungen als *inkjet bioprinting* bezeichnet, ist ein Verfahren, bei welchem Biotinten-Tröpfchen aus einer schmalen Düse abgegeben und präzise positioniert werden. Die zwei gebräuchlichsten Arten sind das thermische und das piezoelektrische Verfahren. [16, 30] In beiden Fällen wird in einer flüssigkeitsgefüllten Kammer ein Druckpuls erzeugt, der zur Abgabe eines Tintentröpfchens aus der Düse führt. Bei ersterem wird in der Kammer eine winzige Flüssigkeitsmenge verdampft, wodurch eine Blase entsteht, die kollabiert und so einen Druckpuls entstehen lässt; im piezoelektrischen Tintenstrahldruck hat die Druckblase eine mechanische Ursache (siehe Abbildung 3 A). [45] Der Tintenstrahldruck erfordert Hydrogele, die sich schnell selbst stabilisieren. Er ist nicht geeignet für die Herstellung großer, klinisch relevanter Konstrukte, da die Abgabe sehr kleiner Volumina bei einem Druck solcher Konstrukte die Dauer um ein Vielfaches steigern würde. Die kleinen Volumina haben hingegen den Vorteil einer hohen Auflösung. [16]

Extrusionsdruck

Beim Extrusionsdruck wird das Hydrogel computergesteuert durch eine Düse kleinen Durchmessers auf eine Trägerplattform gegeben, sodass Biotinten-Stränge entstehen. [16, 30] Das Druckverfahren lässt sich gut mit der Funktionsweise einer herkömmlichen Spritze vergleichen. Der Druckaufbau erfolgt meist pneumatisch oder auf mechanische Weise mit einem Kolben. Seltener, aber ebenfalls üblich, ist der Schraubenantrieb (siehe Abbildung 3 B). [16, 30] Der schmale Düsendurchmesser erfordert zwar eine möglichst flüssige Biotinte, gleichzeitig muss das gedruckte Konstrukt nach der Extrusion aber eine hohe Eigenstabilität aufweisen. [16] Daher werden entweder Tinten verwendet, die hoch viskos sind, oder solche, die Transformationseffekte nutzen, z.B. die ionische Stabilisierung oder auch die Vernetzung infolge einer Temperaturänderung, wie sie bei der thermoreversiblen Gelierung der Gelatine ausgenutzt wird. [20, 30, 46] Die Anwendung viskoser Hydrogel-Vorläufer führt zu Scherkräften, welche die Zellvitalität nachteilig beeinflussen können. [46] Deshalb wird nach Methoden gesucht, diese zu umgehen. Photoaktive Biotinten stellen dafür geeignete Biotintensysteme dar; sie sind niedrig viskos und vernetzen erst nach Belichtung, wobei sich der Zeitpunkt des *crosslinking* variabel gestalten lässt. Ouyang *et al.* zeigen 2017, dass sich bei Anwendung von photoaktiven Biotinten im Extrusionsdruck das sogenannte *in situ-crosslinking* am besten eignet. [46] Hier wird die photoaktive Biotinte in einer lichtpermeablen Kapillare gelagert, wobei die Belichtung direkt vor der Extrusion stattfindet. Vorteile dieses Verfahrens sind

die hohe Zellvitalität dank niedriger Extrusionskräfte, sowie die Stabilität und Homogenität der Filamente nach dem Druck. *Pre-Crosslinking* und *post-crosslinking* schneiden im Vergleich der drei Varianten deutlich schlechter ab, da es hier zu hohen Extrusionskräften oder niedriger initialer Stabilität der Filamente kommen kann. [46]

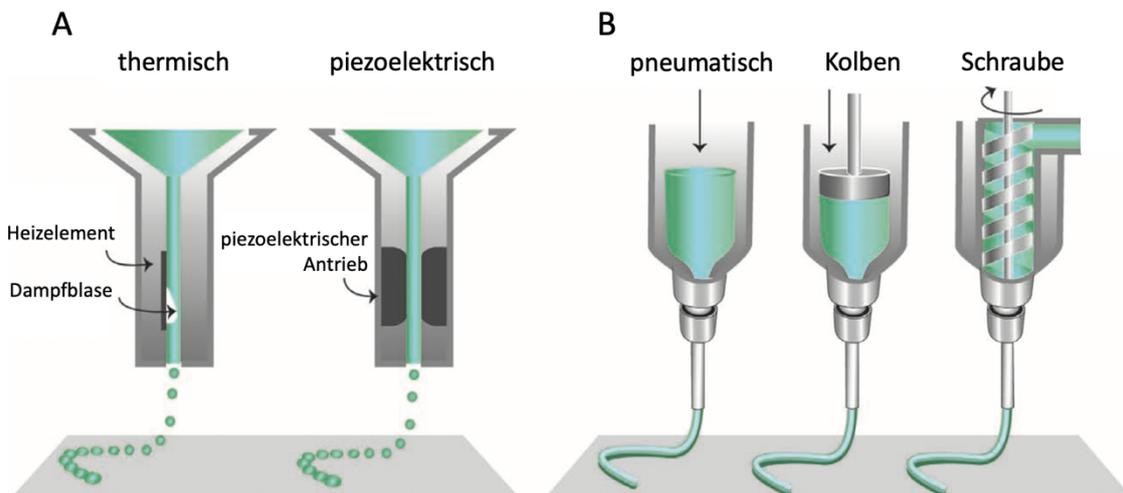


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Tintenstrahl- und Extrusionsdrucks. Der Antrieb des Tintenstrahlendrucks kann thermischer oder piezoelektrischer Herkunft sein (A). Der Extrusionsdruck erfolgt pneumatisch, mit einem Kolben oder einer Schraube (B). Modifiziert nach Malda et al. [30]. Mit Genehmigung von John Wiley and Sons, *Advanced Materials*, 2013. Lizenz 1290263-1.

2.3.2 Lichtbasierte Drucktechniken und volumetrischer Biodruck

Anders als der Extrusionsdruck, welcher Biotinten mit oder ohne Photovernetzungspotenzial drucken kann und bei welchem der Einsatz von Licht vielmehr der Stabilisierung des bereits geformten Konstrukts dient, benötigen die hier vorgestellten lichtbasierten Drucktechniken UV- oder sichtbares Licht, um ein Konstrukt zu formen. Vorteile dieser Techniken sind die Möglichkeit zur Verwendung niedrig viskoser Bioharze, der Verzicht auf kleine Kanülen-Durchmesser, die simple Herstellung komplexer Konstrukte, die höhere Effizienz sowie die gegenüber extrusionsbasierten Techniken verbesserte Auflösung. [8, 9] Der englische Begriff *vat polymerization* bietet einen Überbegriff für lichtbasierte Druckverfahren, bei welchem eine flüssige Präpolymer-Photoinitiator-Lösung, das Harz, während des Drucks in einem Behälter gelagert wird. Die Aushärtung erfolgt selektiv, wobei ein 3D-Konstrukt entsteht. [8] Handelt es sich um einen Biodruck, werden der Präpolymerlösung zusätzlich Zellen beigemischt, wodurch nach der Belichtung kein Harz, sondern ein Bioharz entsteht. [15] Eine mögliche Unterteilung der *vat polymerization* Techniken unterscheidet laser-basierte, projektions-basierte sowie volumetrische

Verfahren, bei welchen der Unterschied primär in der Bestrahlung liegt. Die Polymerisation findet hier punktweise, schichtweise oder im Ganzen statt. [8]

Laser-basierter Druck

Gewöhnlich verwendete laser-basierte Drucktechniken für die Herstellung von 3D-Konstrukten sind die Stereolithographie (SLA) und die Zwei-Photonen-Polymerisation. Im Jahr 1986 entwickelt Charles Hull die erste Form des 3D-Drucks – SLA – an welche sich viele weitere additive Fertigungstechniken schließen, wie z.B. die Schmelzschichtung (engl.: *fused deposition modeling*). [8, 47] In der SLA wird das Konstrukt gebildet, indem ein Laserstrahl anhand einer CAD-Datei über das flüssige Harz gescannt wird, wobei es Punkt für Punkt zur Vernetzung kommt. Nach der Polymerisation einer Schicht wird die Trägerplattform abgesenkt oder angehoben (*bottom-up* oder *top-down* Ansatz) und eine neue Harzschicht fließt nach, welche wiederum schrittweise vernetzt wird (siehe Abbildung 4 A). [8, 9, 48] Vorteil dieses Verfahrens ist die hohe Auflösung, welche bei ca. 30 µm liegt, wenngleich hier mit längeren Druckzeiten gerechnet werden muss. [9, 49] Die Zwei-Photonen-Polymerisation bietet eine weitere Verbesserung der Auflösung, welche sich bis in den Bereich unter 100 nm erstreckt, geht jedoch gleichzeitig mit langen Fabrikationszeiten einher. [50] Dieses Verfahren beruht darauf, dass je zwei Photonen einen Photoinitiator im fokussierten Bereich anregen. Wie bei der SLA initiieren die Radikale anschließend die Polymerisation. [8, 51]

Projektions-basierter Druck

Der projektions-basierte Druck gleicht den laser-basierten Verfahren, da auch hier Schichten aufeinanderfolgend polymerisiert werden, mit dem Unterschied, dass jede Schicht auf einmal vernetzt wird, wodurch sich die Druckdauer verkürzt. Die bekanntesten projektions-basierten Druckverfahren sind die digitale Lichtprojektion (DLP) und die *continuous liquid interface production*. Die DLP zeichnet sich durch die Projektion einer Lichtmaske aus, welche über die variable Anordnung von Mikrospiegeln erzeugt und auf eine dünne Schicht Bioharz geworfen wird. Im Bereich der Projektion kommt es zur simultanen Vernetzung. Die Mikrospiegel, bis zu 1 Mio., setzen sich zu einem sogenannten Mikrospiegelchip zusammen, wobei die einzelnen Spiegel individuell beweglich sind und durch Rotation in eine reflektierende oder nicht reflektierende Stellung bewegt werden können. Nach der Polymerisation einer Schicht, wird, wie in der SLA, neues Präpolymer in einem *bottom-up* oder *top-down* Ansatz bereitgestellt und vernetzt (siehe Abbildung 4 B). [8, 9, 52] Vorteil der DLP gegenüber der SLA ist die kürzere Dauer des Drucks

bei gleichbleibend hoher Auflösung, da je eine Schicht auf einmal vernetzt und nicht punktwise abgefahren wird. [8] Auch die Möglichkeit der Nutzung sichtbaren Lichts stellt einen Pluspunkt dar, da dies die Zellvitalität unterstützt. [53] *Continuous liquid interface production* ist eine beschleunigte Form der DLP bei welcher das Auftragen einer neuen Harzschicht entfällt, da das Konstrukt innerhalb des Harzes polymerisiert wird. Die Bestrahlung erfolgt hier durch ein am Boden des Harz-Behälters liegendes Fenster, wobei eine unerwünschte Vernetzung des dahinterliegenden Harzes durch O₂-Permeabilität des Fensters verhindert wird. [8]

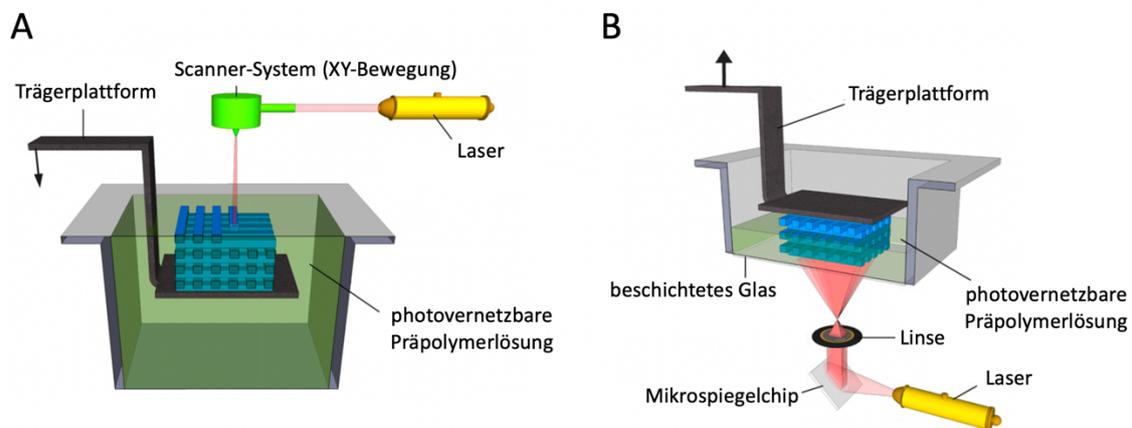


Abbildung 4: Schematische Darstellung der SLA (Stereolithographie) und DLP (digitale Lichtprojektion). Bei der top-down SLA scannt und polymerisiert der Laserstrahl die Präpolymerlösung punktwise (A). Bei der bottom-up DLP wird der Laserstrahl über den Mikrospiegelchip schichtweise auf die Präpolymerlösung geworfen und polymerisiert diese (B). Die Trägerplattform senkt (A) oder hebt (B) sich während des Vorgangs. Modifiziert nach Billiet et al. [54]. Mit Genehmigung von PERGAMON, *Biomaterials*, 2012. Lizenz 1290265-1.

Volumetrischer Biodruck

Das Prinzip des VB ist noch jung. Ältere Drucktechniken, sowohl herkömmlichen als auch lichtbasierten Ursprungs, weisen diverse Nachteile auf. Beim Druck komplexer Strukturen, die sich durch Hohlräume oder Überhänge auszeichnen, werden Unterstützungsstrukturen notwendig. Weiterhin erfordert die Fertigung der Konstrukte meist einen langen Herstellungsprozess, welcher bedingt, dass Zellen unter suboptimalen Bedingungen verweilen müssen. [11, 55] Auch die Scherspannung in Düsen kleinen Durchmessers führt zu Zellbeeinträchtigungen in Form von Schädigungen der Zellmembran. [56] Diese Nachteile, welche nur eine Auswahl darstellen, führen zu einem gesteigerten Interesse an neuen Techniken, wie dem VB, einer Untergruppe der *vat-polymerization*-Verfahren, welcher diese Nachteile verbessert oder eliminiert. [11] Der VB

ermöglicht die Herstellung von Konstrukten unterschiedlicher Größe und Architektur in weniger als 1 min, wobei die Druckdauer nicht mit zunehmender Größe des Gebildes ansteigt, sofern die Bestrahlungsintensität gleich bleibt. [55] Dies stellt einen entscheidenden Unterschied zu anderen lichtbasierten Verfahren, wie der DLP oder SLA dar. Die Druckdauer ist beim VB abhängig von den Harz-Eigenschaften und nicht der Größe des zu druckenden Konstrukts. [11] Bernal *et al.* veröffentlichen 2019 einen Artikel, nach welchem sie mittels VB Volumina von 0,15 bis 0,4 cm³ in unter 30 s drucken. [55] 2022 berichten sie von Druckgeschwindigkeiten kleiner als 20 s für zentimetergroße Konstrukte. [10] Rizzo *et al.* berichten 2021 sogar von der Fertigung diverser Volumina in ca. 10 s. [11] Ein weiterer Vorteil des VB sind die artefaktfreien Konstrukt-Oberflächen, welche das Ursprungsdesign besser nachbilden und die bei der DLP oder dem Extrusionsdruck nicht zu finden sind. Dort kommt es druckbedingt zu Rauigkeiten durch den schichtweisen Aufbau des Konstrukts. [11, 55] Die Auflösung beim VB ist primär abhängig von der Pixelgröße projizierter Bilder, aber auch von der Diffusion chemischer Substanzen sowie der Fokustiefe, da ein Lichtstrahl immer minimal divergiert. So beschreiben z.B. Loterie *et al.* 2018 in einer Publikation diesen Effekt, wobei dort die Auflösung von der Mitte bis zum Rand um 10 µm abnimmt. [55, 57] Die Auflösung, welche durch den VB erzielt wird, liegt in den neuesten Veröffentlichungen etwa zwischen 30 und 200 µm. [10, 11, 55] Damit erreicht dieses Verfahren unter aktuellen Umständen noch nicht die hohe Auflösung anderer *vat polymerization* Verfahren (SLA und DLP). [8] Der VB ist von der reversen Computertomographie inspiriert und läuft wie folgt ab: Eine dreidimensionale CAD-Konstruktion wird mithilfe eines tomographischen Algorithmus (z.B. Radon Transformation) in 2D-Schnittbilder zurückgerechnet, welche unterschiedliche Winkel zum gewünschten Objekt einnehmen. Diese Schnittbilder werden mit einem 405 nm-Laser über einen Mikrospiegelchip auf den mit Harz gefüllten, rotierenden Behälter geworfen. An definierten Punkten, in denen die Vernetzungsdosis überschritten wird, da sich dort Belichtungs Dosen aus unterschiedlichen Winkeln aufaddieren, kommt es zur Vernetzung. So entsteht ein dreidimensionales Voxel-Konstrukt (siehe Abbildung 5). [9, 55] Der Punkt, welcher die Vernetzungsdosis überschreitet, wird als kritische Gellierungsschwelle bezeichnet. Sie ist definiert als die minimal benötigte Lichtdosis, bei der es zur Bildung eines stabilen Netzwerks kommt und muss erreicht werden, da unter dieser die Polymerisation unzureichend ist. Hingegen führt die massive Überschreitung der Schwelle zur Überhärtung des Harzes. [11, 57] Damit ein Bioharz im VB angewandt werden kann, muss es diverse Anforderungen erfüllen: Das optimale Bioharz ist transparent und hat eine Viskosität von mind. 10 Pa*s, damit Zellsedimentation sowie Unschärfen

durch radikalische und molekulare Diffusion umgangen werden können. Weiterhin zeigt es eine reversible Gelierung und ist zytokompatibel. [11, 58] Da die Technologie des VB jedoch sehr neu ist, sind genaue Eigenschaften, welche die für den VB verwendeten Bioharze aufweisen müssen, noch weitestgehend unbekannt. Ein weiterer Nachteil ist, dass bisher nur wenig Wissen dazu existiert, wie eingebettete Zellen auf diese Form des Drucks reagieren. [10] Daher besteht aktuell ein großer Bedarf an VB-assoziiertes Forschung. Neue Studien zeigen bereits erste erfolgreiche Anwendungen des VB in der Forschung: Bernal *et al.* nutzen dieses Druckverfahren 2022 zur Fertigung komplexer, mit Organoiden beladener GelMA-Strukturen, welche wichtige Schlüsselfunktionen der menschlichen Leber, hier die Ammoniakentgiftung, simulieren. [10] Organoide sind dreidimensionale Strukturen, welche aus Stammzellen oder Progenitorzellen gefertigt werden. Diese differenzieren und strukturieren sich zu Geweben, die menschlichen Organen ähneln. [59, 60] Die Kombination aus VB und Organoiden ließe sich potenziell in der regenerativen Medizin oder der Herstellung menschlicher *in vitro* Modelle einsetzen, welche Krankheiten simulieren oder der personalisierten Medikamententestung dienen. Denn Ergebnisse zeigen, dass der VB, dank Düsenfreiheit, keinen mechanischen Stress auf Organoide ausübt. Dies führt, im Vergleich zum Extrusionsdruck und dem Pipettieren von Hydrogelen, zu höherer Zellvitalität und dem Morphologieerhalt von Organoiden und Zellen. [10] Eine weitere Veröffentlichung von Rizzo *et al.* 2021 beschreibt die erfolgreiche Anwendung des VB u.a. für die Herstellung zentimetergroßer, verzweigter und perfundierbarer Gefäßsysteme aus Gel-NB, einem Bioharz aus Gelatine und Norbornen. [11] Das Bioharz ist niedrig funktionalisiert, polymerisiert und enthält wenig Radikale, wodurch eine bessere Zytokompatibilität gewährleistet werden soll. Hingegen beträgt die Auflösung nur ca. 200 μm . [11]

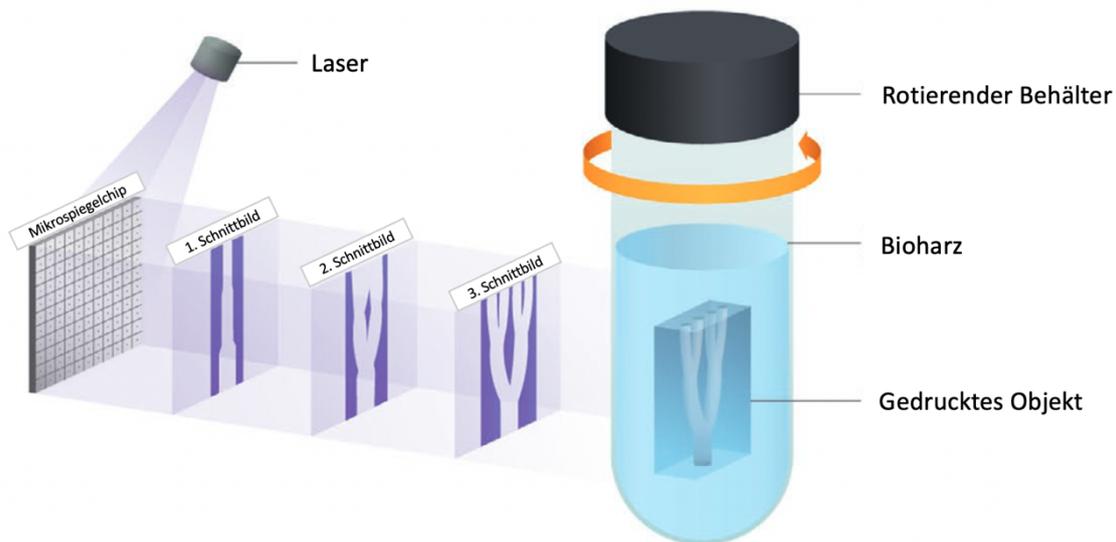


Abbildung 5: Schematische Darstellung des VB (Volumetrischer Biodruck). Der Mikrospiegelchip wandelt den Laserstrahl in verschiedene Projektionen um, die in Synchronisation mit dem rotierenden Behälter auf das Bioharz geworfen werden. Addieren sich Belichtungen aus unterschiedlichen Winkeln in einem Punkt auf und überschreiten die Vernetzungsdosis, so geliert dort das Bioharz. Modifiziert nach Rizzo et al. [11]. Mit Genehmigung von Wiley-VCH, *Advanced Materials*, 2021. Lizenz 1290266-1.

2.4 Zellbiologische Untersuchung von Biotinten

Biotinten basieren meist auf Hydrogelen, welche sich durch ihre Ähnlichkeit zur EZM auszeichnen. [15, 22] Daher stellt die Forschung an diesen ein wichtiges Feld in den Naturwissenschaften dar. So können Hydrogele Zellen bei Implantationen bspw. als vitalitätserhaltende Trägermaterialien dienen und ihnen bioaktive Signale zur Verfügung stellen, welche der Proliferation und Differenzierung dienen. [22] Sowohl während als auch nach der Hydrogel-Herstellung können Zellvitalität und -funktion beeinträchtigt werden: Im Fertigungsprozess lassen sich hier exemplarisch die Kräfte im Extrusionsdruck nennen sowie bei Bestrahlung die Zellschädigung durch UV-Licht oder während der Photopolymerisation entstehende Radikale. [61-63] Die Radikale induzieren z.B. entweder selbst Zellschäden oder bilden mit Sauerstoff reaktive Spezies, welche zu oxidativem Zellstress und infolgedessen zum Zelltod führen können. [63, 64] Nach der Herstellung nehmen hingegen spezifische Eigenschaften der Hydrogele Einfluss auf die Zellen. Dazu zählen bspw. die Porengröße der Gele, welche für die Nahrungs- und Abfalldiffusion wichtig ist und die Zellfunktionen maßgeblich beeinflusst sowie die Polymerkonzentration, welche auf das Spreizungsverhalten Einfluss hat. Auch die Degradierbarkeit der Hydrogele und das Vorhandensein zelladhäsiver Sequenzen können

auf Zellen einwirken. [42, 43, 65, 66] Daher existieren inzwischen einige Möglichkeiten, die zelltragenden Hydrogele untereinander anhand zellbiologischer Assays zu vergleichen, welche die Vitalität, den Metabolismus oder die Proliferation dieser bewerten. Dabei weist jeder Assay eigene Vor- und Nachteile auf.

2.4.1 Zellen

In Hydrogele können verschiedene Zellarten eingebettet werden, von denen jeder Typ gewisse Vor- und Nachteile aufweist. Die wissenschaftliche Fragestellung bestimmt, ob immortalisierte Zelllinien, Primärkulturen oder Stammzellen eingesetzt werden, welche meist dem Menschen oder Tier entstammen.

Permanente Zelllinien

Zelllinien sollen die Funktionen der zugrundeliegenden Primärzellen möglichst genau simulieren. [67] Sie sind unsterblich; entweder aufgrund zellimmanenter Eigenschaften (Tumorzellen) oder durch den Einfluss gentechnischer Modifikationen, die zur Immortalisierung führen. Die bekannteste Form der Immortalisierung ist hier die stabile *in vitro*-Transfektion mit viralen Genen, die eine unbegrenzte Zellteilungsfähigkeit vermitteln. [68] Zelllinien haben neben der Unsterblichkeit viele weitere Vorteile; dazu zählen die einfache Handhabung, das unendliche Angebot, der niedrige Kostenfaktor und die Reinheit der Zellpopulationen, welche eine gute Reproduzierbarkeit gewährleisten. Wegen dieser Vorteile werden sie oft als Alternative zu primären Zellen verwendet; bspw. bei der Herstellung von Impfstoffen oder pharmazeutischen Produkten, artifiziellem Gewebe oder bei der Testung von Medikamenten auf ihre Toxizität hin. [67, 69] Auch in dieser Arbeit wurde aus genannten Gründen die adhärente Mausfibroblasten-Zelllinie NIH-3T3 herangezogen. Jedoch müssen auch die Nachteile von Zelllinien bedacht werden. Wenngleich sie in ihrem Verhalten Primärzellen simulieren, stellen sie oft keine exakten Replikat dar, wie auch Kaur und Dufour 2012 exemplarisch an Sertoli-Zelllinien zeigen. Zwar weisen diese die Hauptcharakteristika der Sertoli-Primärzellen auf, replizieren sie jedoch nicht vollständig, da sie genetisch manipuliert wurden. Dies kann sich in einem veränderten Phänotyp, einer anderen Funktionsweise und einer veränderten Antwort auf äußere Stimuli zeigen. Weiterhin entstehen über eine prolongierte Passagierung genotypische und phänotypische Variationen der Zellen. Zuletzt kann es leicht zu Kontaminationen kommen; einerseits mit anderen Zellen, welche Zelllinien bei schnellerer Proliferation komplett ersetzen können, oder mit Mykoplasmen, welche die

Fähigkeit haben, Genexpression und Zellverhalten zu beeinflussen, ohne dabei entdeckt zu werden. [67]

Primärzellen

Zu den Primärzellen zählen bspw. HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*), welche aus der Gefäßwand der Nabelschnur stammen. [70] Der offensichtliche Vorteil ist, dass sie direkt aus Organen oder dem Gewebe entnommen werden und somit *in vitro* die gleichen Eigenschaften aufweisen, durch die sie auch *in vivo* gekennzeichnet sind. [68] Bei Schlüsselexperimenten, welche zuvor mit Zelllinien durchgeführt wurden, wird daher die Reproduktion der Versuche mit primären Zellen empfohlen. [67] Neben dem großen Nachteil, dass es sich bei Primärzellen um finite Kulturen handelt, die sich nicht unbegrenzt kultivieren lassen, muss bedacht werden, dass sich Primärzellen auch im Laufe einer kürzeren Kultivierung oft in ihrem Teilungs- und Differenzierungsverhalten verändern. [68] So kann eine gute Vergleichbarkeit zwischen Experimenten nur in niedrigen Passagen gewährleistet werden. Weiterhin sind mehrere Versuche notwendig, um statistisch belastbare Daten aus dem Material verschiedener Spender zu generieren.

Stammzellen

Die letzte Zellgruppierung, welche Verwendung in der Hydrogel-Forschung findet, ist die der Stammzellen. Dieser undifferenzierte Zelltyp, d.h. ohne bereits festgelegte Ausprägung, kann sich durch den Einfluss von Wachstums- und anderen Faktoren in viele unterschiedliche Zelltypen entwickeln. MSCs (*mesenchymal stem cells*) gehören zu den multipotenten Stammzellen und können chirurgisch gewonnen werden. Sie sind in der Lage, sich bspw. zu Osteozyten, Chondrozyten, Myozyten oder Fibrozyten zu differenzieren. [68] Sie werden wegen ihres Differenzierungspotenzials gerne in der Forschung an Biotinten verwendet, um dem Einfluss von Hydrogelen auf das Differenzierungsverhalten der Stammzellen zu untersuchen.

2.4.2 Methoden

Um den Einfluss von Hydrogelen auf darin eingebettete Zellen zu bewerten, finden Assays Anwendung, die bspw. die Vitalität oder Proliferation von Zellen messen. Die schnelle und präzise Einschätzung der Einwirkung chemischer, physikalischer und anderer Stimuli ist essenziell für die Forschung an Biotinten, aber auch für andere Bereiche, in denen Effekte auf Zellen geprüft werden, z.B. den Einfluss von Medikamenten auf

diese. [71] Da alle nachfolgenden Assays Vor- und Nachteile aufweisen, hat es sich auch hier als sinnvoll erwiesen, verschiedene Assays miteinander zu kombinieren.

Vitalitäts-Assays

Vitalitäts-Assays basieren auf diversen Zellfunktionen wie der zellulären Enzymaktivität, der Coenzym- oder Adenosintriphosphat-Produktion, aber auch die Permeabilität der Zellmembran bietet Aufschluss über den Zustand der Zelle. [72, 73] Damit bauen die meisten Vitalitäts-Assays auf dem zellulären Stoffwechsel auf und können in solchen Fällen als metabolische Assays bezeichnet werden. Die einfachsten und kostengünstigsten Assays sind Farbstoff-Ausschluss-Assays. Sie beruhen auf der Exklusion von Farbstoffen (wie Trypanblau) aus lebenden Zellen, wohingegen diese in tote Zellen mit gestörter Membranintegrität eindringen können. Ein Nachteil ist die Fehleranfälligkeit dieser Assays und der hohe Zeitaufwand bei größeren Probenmengen, wenn die Zellen unter dem Mikroskop mit dem Hemozytometer gezählt werden. [73, 74]

Die Assays der zweiten Gruppierung lassen sich unter dem Begriff „Fluorometrische Assays“ zusammenfassen. [74] Sie basieren auf fluoreszierenden Farbstoffen und Produkten. In vorliegender Arbeit wurde unter anderem der Live/Dead-Assay zur Prüfung der Zellvitalität herangezogen. Diese einfache und schnelle Methode verwendet fluoreszierende Farbstoffe, welche es ermöglichen, zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden. Nur tote Zellen mit einer beschädigten Zellmembran können Ethidium Homodimer aufnehmen, das im Zellkern durch die Bindung an Desoxyribonukleinsäure eine starke Rotfluoreszenz entwickelt. Hingegen nehmen lebende Zellen zellmembrangängiges Calcein Acetoxymethyl Ester (Calcein AM) auf, welches sie mithilfe zellulärer Esterasen spalten können, wobei grün fluoreszierendes Calcein entsteht. Da nur vitale Zellen metabolisch aktiv sind, kann Calcein AM auch nur dort hydrolysiert werden. [73, 75] Auch der Resazurin-Assay ist weit verbreitet. Bei diesem dringt die blaue nicht-fluoreszierende Verbindung Resazurin in Zellen ein und wird dort von vitalen Zellen zum rot fluoreszierenden Resorufin reduziert. Die Menge des Resorufins kann quantifiziert werden und ist proportional zur Anzahl vitaler Zellen. Dieser Assay ist nicht nur kostengünstig, sondern auch sensitiver als Assays, welche Tetrazolium Salze verwenden, z.B. das Cell Counting Kit 8. Von Nachteil ist hingegen der toxische Effekt auf Zellen. [74] Dieser zytotoxische Effekt kann aus Assays Endpunkt-Assays machen. [73] So stellt der Resazurin-Assay einen Endpunkt-Assay dar, nach welchem keine weiteren Zellversuche mehr durchgeführt werden können. Die Fluoreszenz der Produkte fluorometrischer Assays kann

entweder mit einem *microplate reader* gemessen oder unter dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden. [74]

Kolorimetrische Assays bewerten den Zellmetabolismus durch Quantifizierung eines biochemischen Markers, indem die verwendeten Reagenzien durch enzymatische Aktivität vitaler Zellen eine messbare Färbung entwickeln. [74] Der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Assay wurde in den 1980er Jahren erfunden und ist damit der erste kolorimetrische Assay seiner Art. Durch die zelluläre, enzymatische Reduktion des MTT entsteht lilafarbenes Formazan, welches durch Lichtabsorption quantifiziert wird und dadurch Aufschluss über die Zellvitalität gibt. Er dient als Standardmethode und findet weiterhin breite Anwendung. Zu den Nachteilen des Assays zählen jedoch sein wasserunlösliches Produkt (Formazan), welches vor Messung aufgelöst werden muss, seine Instabilität und Zytotoxizität, sowie seine niedrigere Sensitivität im Vergleich zu anderen Assays, z.B. zum Cell Counting Kit 8. Deshalb werden heutzutage bevorzugt andere Assays verwendet. [74, 76] Das Cell Counting Kit 8, welches in vorliegender Arbeit verwendet wurde, bietet eine geeignete Alternative bei der quantitativen Messung der Dehydrogenase-Aktivität und nutzt wasserlösliches Tetrazolium-Salz. Dieser Assay verwendet wasserlösliche Tetrazolium-Salz WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium), wobei neben diesem noch viele weitere Salze existieren. [77] Trotzdem gehört WST-8 aus nachfolgenden Gründen zu den meist genutzten Tetrazolium Salzen: Es hat eine größere Sensitivität als WST-1, ist nicht zytotoxisch, da es nicht in die Zellen eindringt, das resultierende Formazan ist wasserlöslich und das Kit lange stabil. [74, 78] WST-8 wird durch Elektronenübertragung von NAD(P)H (protoniertes Nicotinamidadeninukleotid(phosphat)), ein Cofaktor für Dehydrogenasen und einige weitere enzymatische Reaktionen, zum wasserlöslichen, orangefarbenen Formazan reduziert. Formazan hat ein Absorptionsmaximum von 450 nm und kann auf diese Weise mit einem *microplate reader* detektiert werden. Da die Menge des Formazans proportional zur NAD(P)H-Konzentration ist, lässt sich so eine Aussage zur Zellvitalität treffen. [77]

Die letzte Gruppe der Vitalitäts-Assays bilden luminometrische Assays. Diese Assays zeichnen sich durch ein leuchtendes Signal aus, welches nach Reagenz-Zugabe kontinuierlich abgegeben wird und mit sinkender Zellvitalität abnimmt. Der ATP (Adenosintriphosphat)-Assay lässt sich in diese Gruppierung einordnen. Er basiert auf einer luciferase-katalysierten Reaktion, bei welcher Luciferin zu Oxyluciferin reagiert. Diese Reaktion kann nur im Beisein von ATP ablaufen, wobei ein lineares Verhältnis zwischen

diesem und dem luminometrischen Signal besteht. [74] So kann ATP auch direkt die Zellaktivität anzeigen.

DNA-Assays

Ng *et al.* empfehlen 2005, in dreidimensionalen Kulturen sowie zweidimensionalen Kulturen mit hoher Zelldichte, auf die Quantifizierung des totalen DNA-Gehalts zurückzugreifen, um die Zellproliferation zu bestimmen. [79] Dies hat den Hintergrund, dass metabolische Assays, d.h. der Großteil aller Vitalitäts-Assays, unter 3D-Kultivierungsbedingungen fehlerbehaftet sein können, da die metabolische Aktivität nur im flüssigen Überstand des Konstruktes gemessen werden kann. Es wird somit angenommen, dass innerhalb und außerhalb des Konstruktes die gleichen Konzentrationen an Metaboliten vorliegen; dies entspricht jedoch nicht immer der Realität. [79] Trotzdem kann erwartet werden, dass besonders der CCK-8 (Cell Counting Kit-8)-Vitalitätsassay für Hydrogele gut geeignet ist, da WST-8 aufgrund seiner Wasserlöslichkeit ins Gellinere gelangen kann. Auch das entstandene Formazan ist sehr gut im Medium löslich, weshalb die Annahme besteht, dass es so problemlos in den Überstand diffundieren wird. [74] Eine weitere Limitation metabolischer Assays besteht in der andauernden Änderung des Stoffwechsels während des Lebenszyklus einer Zelle. [80] Daher empfiehlt sich die Anwendung von Assays, welche die Nukleinsäure-Menge und damit die tatsächliche Zellzahl zu bestimmen vermögen, ohne dabei von Änderungen des zellulären Metabolismus betroffen zu sein. Cyanin-Farbstoffe wie PicoGreen oder CyQuant binden an die Desoxyribonukleinsäure, woraufhin sich ihre niedrige intrinsische Fluoreszenz um ein Vielfaches erhöht. Der PicoGreen-Assay, welcher auch in vorliegender Arbeit Anwendung findet, bindet selektiv an doppelsträngige DNA (dsDNA). [80] Die Sensitivität des Assays ist sehr hoch; es werden bereits 100 Zellen oder 0,5 ng dsDNA erkannt. Außerdem ist bereits die Detektion kleiner Unterschiede in der Zellzahl möglich, da nur geringfügig erhöhte Zellzahlen bereits mit einem starken Anstieg der Fluoreszenz einhergehen, wie auch Blaheta *et al.* 1998 zeigen. [81] Ein Nachteil des PicoGreen-Assays ist, dass die Zellen vorher verdaut werden müssen, da das Reagenz intakte Zellmembranen nicht queren kann. Der Papainase-Verdau erzielt hier die besten Ergebnisse, bei welchem sowohl die Zellmembran als auch intrazelluläre Proteine zerstört werden, die nukleäre DNA jedoch intakt bleibt. [81] Da in vorliegender Arbeit zusätzlich eine enzymatische Auflösung der Hydrogele nötig war, um vorher die Zellen aus den Gelen zu befreien, wurde ebenfalls entschieden, den Papainase-Verdau heranzuziehen. Der CyQuant-Assay zeigt im Vergleich mit dem PicoGreen eine noch höhere Sensitivität. Von Nachteil

ist jedoch, dass der Fluoreszenz-Farbstoff sowohl an DNA als auch an RNA bindet, wenngleich das Fluoreszenzsignal bei der Bindung des Reagenzes an DNA deutlich größer ausfällt. [82] Ein Nachteil aller DNA-Assays ist, dass die Reagenzien an jeden DNA-Strang binden und dabei nicht zwischen lebenden und geschädigten oder toten Zellen unterscheiden. Dies stellt v.a. in 3D-Konstrukten einen Nachteil dar, da tote Zellen nicht so schnell aus diesen ausgewaschen werden können, wie dies in Monolayern bspw. der Fall ist. Da in vorliegender Arbeit hingegen die Anzahl vitaler Zellen von Interesse war, wurden zusätzlich Vitalitätsassays in das Analyseprotokoll der Hydrogele mit aufgenommen.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

In Tabelle 1 bis Tabelle 10 sind verwendete Materialien und Geräte aufgeführt. Unter 3.1.6 sind die Zusammensetzungen verwendeter Puffer und Lösungen zusammengefasst.

3.1.1 Technische Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 1: Übersicht technischer Geräte und Hilfsmittel.

Gerät	Hersteller
Analysewaage Sartoriuswaage II	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen (DE)
Analysewaage SBA 32	ScalTec Instruments GmbH, Göttingen (DE)
Analysewaage XSE104	Mettler-Toldeo GmbH, Gießen (DE)
Casy Cell Counter and Analyzer System Model TTT	OLS® OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen (DE)
Duran® Laborglasflaschen	Schott AG, Mainz (DE)
Eismaschine	Scotsman Ice Srl., Mailand (IT)
ElectroForce 5500	Bose GmbH, Friedrichsdorf (DE)
Gefrierschrank Liebherr Premium	Liebherr International S.A., Bulle (CH)
Heizplatte	Individuelle Anfertigung FMZ
Inkubator HERAcell 150i CO ₂	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (US)

3 Material und Methoden

Inverses Fluoreszenzmikroskop ZEISS Axio Observer / Colibri 7 /Axiocam 506 mono	Carl Zeiss AG, Oberkochen (DE)
Inverses Phasenkontrastmikroskop Leica DMIL	Leica Microsystems, Wetzlar GmbH (DE)
Kühlschrank Bosch economic	Robert Bosch GmbH, Stuttgart (DE)
Kühlschrank Liebherr Premium NoFrost	Liebherr International S.A., Bulle (CH)
Mehrkanalpipette Pipet-Lite L8-300 XLS+	Rainin via Mettler-Toldeo GmbH, Gießen (DE)
Microman ^{TE} Direktverdrängungspipette M100, M1000	Gilson Germany/Austria, Limburg-Offheim (DE)
Mikroskop VisiScope IT 404 / Axiocam 105 color	VWR International GmbH, Darmstadt (DE)
Mini-Zentrifuge Sprout	Heathrow Scientific, Vernon Hills, Illinois (US)
Multikanal Pipette Pipet-Lite XLS	Mettler-Toldeo GmbH, Gießen (DE)
Multimode-Mikroplatten-Reader, Spark® 20M multimode microplate reader	Tecan Group AG, Männedorf (CH)
Ofen Universalschrank UN30	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach (DE)
pH-Meter inoLab Multi Level 1	WTW GmbH & Co. KG, Tuttingen (DE)
Pinzetten	A. Hartenstein GmbH, Würzburg (DE)

3 Material und Methoden

Pipette, Multipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg (DE)
Pipette, PIPETMAN® P20, P100, P200, P1000	Gilson Germany/Austria, Limburg-Offheim (DE)
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim (DE)
Roller Mixer SRT2	Stuart Scientific via Bibby Scientific Ltd., Staffordshire (GB)
Schüttler rotierend Rotamax 120	Heidolph Instruments GmbH & co. KG, Schwabach (DE)
Sicherheitswerkbank Labgard Class II	Nuaire Inc., Plymouth, Minnesota (US)
Silikonförmchen	Individuelle Anfertigung FMZ
Spatel	A. Hartenstein GmbH, Würzburg (DE)
Stoppuhr	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt (DE)
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg (DE)
Ultraschallreiniger Sonorex RK 52 H	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin (DE)
Universalzentrifuge Heraeus™ Multifuge™ X3R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (US)
UV-Lampe	A. Hartenstein GmbH, Würzburg (DE)

3 Material und Methoden

UV-LED-405nm Lampe	Sovol
Varioklav Dampfsterilisator	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim (DE)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, New York (US)
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach (DE)
Zentrifuge Mega Star 1.6R	VWR International GmbH, Darmstadt (DE)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Übersicht verwendeter Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
Aluminiumfolie	Melitta Unternehmensgruppe Bentz KG, Minden (DE)
CASY cups	OMNI Life Science GmbH & Co KG, Bremen (DE)
Combitips advanced (2,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg (DE)
Dublisil® 15	Dreve Otoplastik GmbH, Unna (DE)
Einmalkanülen BD Microlance™ 3, 20 G	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg (DE)
Glasbodenschale GWSB5040	WillCo Wells B.V., Amsterdam (NL)
Kapillarkolbenspitzen CP 1000, CP 100	Gilson Germany/Austria, Limburg-Offheim (DE)
Kimtech® Science Präzisionstücher	Kimberly-Clark GmbH, Koblenz (DE)
Labormarker	VWR International GmbH, Darmstadt (DE)
Microplatte 96-Well, schwarz	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)
Nunclon™ Delta Surface Zellkulturplatten (48-, 96-Well)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (US)
Pasteurpipetten	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim (DE)
Petrischale 92 x 116 mm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht (DE)

3 Material und Methoden

Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht (DE)
Pipettenspitzen RC LTS 300 µl	Mettler-Toldeo GmbH, Gießen (DE)
Plastikbecher 200 ml	Pro-Pac Ostendorf Plastic Thermoformfolien und Verpackungen GmbH & Co. KG, Vechter (DE)
Reagiergefäß SafeSeal (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht (DE)
Rollrandgläser mit Deckel (10 ml)	A. Hartenstein GmbH, Würzburg (DE)
Serologische Pipetten Cellstar® (5, 10, 25, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)
Spritzen BD Discardit™ II (2, 5, 10 ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg (DE)
Spritzenvorsatzfilter Filtropur S (0,2 und 0,45 µm)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht (DE)
Spritzenvorsatzfilter Nalgene™ (0,2 µm, 13 mm)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (US)
Untersuchungshandschuhe aus Nitril	Qube Medical Products Sdn Bhd, Selangor (MY)
Urinbecher (100 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt (DE)
VWR Vacuum Filtration (500 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt (DE)
Zellkulturflasche Cellstar® (250 ml, 75 cm ² und 550 ml, 175 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)
Zentrifugenröhrchen Cellstar® Tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)

3.1.3 Chemikalien und Kits

Tabelle 3: Übersicht verwendeter Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller
Calciumchlorid (CaCl ₂), CAS # 10043-52-4	Sigma-Aldrich via Merck KGaA, Darmstadt (DE)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), CAS # 7365-45-9, Lot # SLCD6051	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (DE)
CASYton	OMNI Life Science GmbH & Co KG, Bremen (DE)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (DE)
Essigsäure 100%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (DE)
Ethanol vergällt (>99,8 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (DE)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich via Merck KGaA, Darmstadt (DE)
L-Cystein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (DE)

3 Material und Methoden

Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (DE)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Sigma-Aldrich via Merck KGaA, Darmstadt (DE)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3), CAS # 144-55-8	Merck KGaA, Darmstadt (DE)
Papain Suspension, Lot # 30N2059, 1260 U/ml	Worthington, Lakewood (US)
Reinstwasser	Destillierapparat, FMZ Würzburg (DE)
Silikon Dublisisil [®] 15	Dreve Dentamid GmbH, Unna (DE)
Thesit [®]	Sigma-Aldrich via Merck KGaA, Darmstadt (DE)

Tabelle 4: Übersicht verwendeter Kits.

Kits	Hersteller
Cell Counting Kit-8 (CCK-8)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (US)
Calcein Acetoxymethylester (Calcein AM 1 mg/ml), Lot # 2261443	Invitrogen via Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (US)
Ethidium-Homodimer 1 (EthD-1), Solution, 2 mM, Lot # 2261453	Invitrogen via Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (US)
Ethidium-Homodimer 1 (EthD-1), Solution, 2 mM, Lot # MKCM1108	Sigma-Aldrich via Merck KGaA, Darmstadt (DE)
Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit	Invitrogen via Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (US)

3.1.4 Zelllinien, Zellkulturmedien, -seren und -zusätze

Tabelle 5: Übersicht verwendeter Zelllinien.

Zellen	Hersteller
NIH-3T3-Zellen (ATCC® CRL-1658™)	ATCC via LGC Standards, Wesel (DE)
NIH-3T3-Zellen (DSMZ ACC 59)	DSMZ, Braunschweig (DE)

Tabelle 6: Übersicht verwendeter Zellkulturmedien.

Zellkulturmedium	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (1x) + GlutaMAX™ -I, + 4,5 g/L D-Glucose, + Pyruvate	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham (US)

Tabelle 7: Übersicht verwendeter Zellkulturseren.

Seren	Hersteller
Fötale Kälberserum, Fetal Bovine Serum, # F7524, Lot # BCBV0083	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (DE)
Kälberserum, Bovine Calf Serum, # 12133C, Lot # 19M014	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (DE)

Tabelle 8: Übersicht verwendeter Zellkulturzusätze.

Puffer, Enzyme, Medienzusätze	Hersteller
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) Modified, without calcium chloride and magnesium chloride, 10x	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (DE)
Penicillin Streptomycin (10,000 U/ml)	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham (US)
Trypsin/EDTA 0,05 % (1X)	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham (US)

3.1.5 Hydrogelkomponenten

Tabelle 9: Übersicht verwendeter Hydrogelkomponenten.

Hydrogelkomponenten	Hersteller
Gelatine 1890-500G, CAS # 9000-70-8, Lot # SLBT6921	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (DE)
Alginat Protanal LF 10/60 FT, Lot # GQ7205601	FMC Biopolymer, Philadelphia (US)
GelMA	Synthetisiert am FMZ von Csaba Gergely, Würzburg (DE)
Lithiumphenyl-2,4,6- trimethylbenzo- ylphosphinate (LAP), CAS # 85073-19- 4, Lot # WXBD2166V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (DE)

Tabelle 10: Übersicht verwendeter Hydrogelzusätze.

Hydrogelzusätze	Hersteller
Hu Plasma Fibronectin, FC010 (1 mg/ml) Lot # 2899756	MilliporeSigma, Temecula (US)
Kollagen Typ I, rat tail (10 mg/ml), Lot # NF210621FE	ibidi GmbH, Gräfelfing (DE)

3.1.6 Puffer und Lösungen

1 x PBS⁻-Puffer (ohne MgCl₂, CaCl₂):

- 40 ml 10 x PBS
- 360 ml Reinstwasser
- Lösung autoklaviert.

1 x TE-Puffer:

- 1 ml 20 x TE-Puffer
- 19 ml steriles Reinstwasser

Essigsäure 0,1 %:

- 49,95 ml Reinstwasser
- 50 µl 100% Essigsäure
- Lösung steril filtrieren.

Neutralisationsstammlösung:

- 14,24 µg/ml HEPES
- 5,92 µg/ml NaHCO₃
- 2x PBS⁻
- Lösung steril filtrieren.

PBE-Puffer:

- 6,53 g Na₂HPO₄
- 6,48 g NaH₂PO₄
- 10 ml 500 mM EDTA
- 900 ml Reinstwasser
- Einstellen des pH-Werts auf 6,5, dann Auffüllen mit Reinstwasser auf 1 l, zuletzt steril filtrieren.

PBS⁺-Puffer (mit MgCl₂, CaCl₂):

Zum Waschen von AlgGel-Gelen,
um Auflösung dieser zu vermeiden.

- 50 ml 10 x PBS
- 50 ml MgCl₂ (1 g/l)
- 50 ml CaCl₂ (1 g/l)
- 350 ml Reinstwasser
- Lösung steril filtrieren.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Zur Herstellung der zellbeladenen Hydrogele wurde die adhärenente Mausfibroblasten-Zelllinie NIH-3T3 verwendet. Es wurden dabei zwei verschiedene Zellkulturen derselben Zelllinie von unterschiedlichen Herstellern eingesetzt: Einerseits die Zellkultur CRL-1658TM des Herstellers ATCC[®], welche auf Empfehlung hin mit bovinem Kälberserum als wachstumsförderndem Supplement inkubiert wurde. [83] Andererseits kam die Zellkultur ACC 59 des Herstellers DSMZ zum Einsatz, welche mit fötalem Kälberserum supplementiert wurde. [84] Zunächst wurde 1 ml Zellsuspension der jeweiligen Zellen aufgetaut. Zusammen mit 9 ml Medium wurde die Zellsuspension bei Raumtemperatur und 1000 rpm 5 min zentrifugiert, um anschließend unter sterilen Bedingungen den Überstand vom verbliebenen Zellpellet abzusaugen. Dieses wurde in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in eine T75-Zellkulturflasche mit insgesamt 15 ml Medium ausgesät und zur Zellvermehrung im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und ca. 95 % relativer Luftfeuchte gelagert. Die NIH-3T3-Zellen wurden bei einer Konfluenz von etwa 80 %, entsprechend zweimal pro Woche, gesplittet. Dafür wurden sie unter sterilen Bedingungen zunächst mit 10 ml PBS⁻ gewaschen und im Anschluss mit 1 ml 0,05 % Trypsin/EDTA bei 37 °C 4 bis 5 min inkubiert, um die Zellen von der Flasche zu lösen. Dies wurde nach mehrmaligem Klopfen unter dem Mikroskop kontrolliert. Waren die Zellen beweglich, wurde die Reaktion durch Zugabe frischen Mediums gestoppt. Nach mehrmaligem resuspendieren, wurde Zellsuspension entnommen und in eine neue Zellkulturflasche mit 15 ml frischem Medium überführt. Das Split-Verhältnis wurde nach Bedarf angepasst und betrug zwischen 1:20 und 1:26. Die Zellen wurden bis zum nächsten Splitten im Inkubator gelagert.

3.2.2 Herstellung der Hydrogele

In vorliegender Arbeit wurden zylindrische Hydrogele mit einer Größe von 6 x 1 mm und 4 x 4 mm (Durchmesser x Höhe) hergestellt. Die Gele wurden dafür in Silikonförmchen pipettiert und in diesen vernetzt.

3.2.2.1 Alginate-Gelatine-Hydrogele

In Anlehnung an das Protokoll von Wüst *et al.* 2014 wurden Alginate-Gelatine-Hydrogele mit einer Konzentration von 2 % (m/v) Alginate und 10 % (m/v) Gelatine unter sterilen Bedingungen hergestellt. [34] Pro Bedingung wurden einen Tag vor Versuchsbeginn

jeweils 40 mg Alginat und 200 mg Gelatine in je einem 10 ml-Rollrandglas abgewogen und anschließend unter der Sterilbank für 20 min mithilfe von UV-Licht der Wellenlänge 245 nm sterilisiert. Im Anschluss wurden 1000 μl PBS⁺ zum Alginat und 900 μl PBS⁺ zur Gelatine pipettiert, mit der Pipettenspitze verrührt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Herstellung zellbeladener Hydrogele wurden am Tag der Gelherstellung kultivierte NIH-3T3-Fibroblasen, wie unter 3.2.1 beschrieben, aus der Zellkulturflasche gelöst und die Reaktion mit 6 ml Medium gestoppt. In dieser Zellsuspension wurde die Zellzahl pro Milliliter im Casy Cell Counter bestimmt, indem 100 μl zu 10 ml Casy-Isotonlösung in ein Casy-Cup gegeben wurden. Pro 2 ml Gel wurden 10×10^6 Zellen benötigt (entspricht 5×10^6 Zellen pro 1 ml). Das entsprechende Volumen an Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert und 5 min bei 1000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das verbliebene Zellpellet wurde, nach Absaugen des Überstandes, in 100 μl PBS⁺ resuspendiert und anschließend in die aufgelöste Gelatine pipettiert. Die zellbeladene Gelatine wurde in das gelöste Alginat pipettiert und unter Vermeidung von Blasenbildung vermischt. Um entstandene Blasen zu entfernen, wurde die Gelmischung für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Herstellung der Gele erfolgte im Anschluss unter Zuhilfenahme einer Direktverdrängungspipette. Es wurden 30 μl Biotinte in jede 6 x 1 mm Silikonmulde gegeben. Die anschließende Vernetzung mit 20 mM CaCl₂, welches auf die Hydrogele in den Silikonförmchen pipettiert wurde, erfolgte bei Raumtemperatur für 10 min, nach welchen die Gele mit einem Spatel entnommen wurden. Die Hydrogele wurden anschließend in einer 48-Wellplatte in jeweils 1 ml des entsprechenden Zellkulturmediums im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und ca. 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde meist einen Tag vor der nächsten Messung, entsprechend an Tag 3 und Tag 6, durchgeführt.

3.2.2.2 GelMA-Hydrogele

Die in dieser Arbeit hergestellten Gelatine-Methacrylat-Hydrogele enthielten einen Anteil von 8 %, 7 % oder 6 % (m/v) GelMA und 0,1 % (m/v) LAP. Die Herstellung der GelMA-Gele erforderte die vorherige Synthese lyophilisierten GelMAs durch den Doktoranden Csaba Gergely am FMZ (Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde) in Würzburg. Um eine 10 % (m/v) GelMA-Stammlösung herzustellen, wurde einige Tage vor Hydrogel-Herstellung das bereitgestellte Lyophilisat mit einem Spatel zerkleinert und je 1 g in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen abgewogen. Um es in je 10 ml PBS⁻ zu lösen, wurde es für ca. 3 h bei 30 °C im Ultraschallbad gelagert. Die anschließende Filtration des gelösten GelMAs erfolgte mit zwei bis drei

0,45 µm-Spritzenvorsatzfiltern. Die Stammlösung wurde bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert. Einen Tag vor Herstellung der Gele wurde der Photoinitiator, eine 1 % (m/v) LAP-Stammlösung, vorbereitet. Dafür wurden 10 mg LAP, lichtgeschützt durch Aluminiumfolie, auf einem Rolltisch für mind. 2 min in 1 ml PBS⁻ gelöst und im Anschluss mit einem 0,2 µm-Spritzenvorsatzfilter sterilfiltriert und bis zur Verwendung lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert. Pro Bedingung wurde 1 ml Gel mit einer Konzentration von 8 %, 7 % oder 6 % GelMA unter sterilen Bedingungen hergestellt. Aus der erwärmten 10 % GelMA-Stammlösung wurden entsprechend 800 µl, 700 µl oder 600 µl in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und im Wasserbad bis zur Verwendung gelagert, um eine Gelierung vorzubeugen. Wie unter 3.2.2.1 beschrieben, wurden für die Herstellung zellbeladener GelMA-Gele die Zellen aus der Zellkulturflasche gelöst und das Volumen an Zellsuspension entnommen, welches 1×10^6 NIH-3T3-Zellen entsprach, um eine Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml Gel zu erhalten. Diese Zellkonzentration wurde abweichend von jener in den AlgGel-Gelen gewählt, um eine weitgehend lichtdurchgängige Zell-Gel-Mischung zu erhalten und weiterhin Lichtstreuungseffekte durch eine hohe Zelldichte zu vermeiden und so die Vernetzung wie programmiert zu erreichen. Die Zellsuspension wurde 5 min bei Raumtemperatur und 1000 rpm zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes das Zellpellet je nach gewünschter Konzentration - 8 %, 7 % oder 6 % - in 100 µl, 200 µl oder 300 µl PBS⁻ resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in das jeweils mit GelMA vorbereitete Reaktionsgefäß pipettiert und mit einer Direktverdrängungspipette resuspendiert. Von der 1 % LAP-Stammlösung wurden unter Lichtausschluss 100 µl zum zellbeladenen GelMA pipettiert und erneut resuspendiert. Je 6 x 1 mm Silikonmulde wurde mit einer Direktverdrängungspipette 30 µl Biotinte pipettiert, je 4 x 4 mm Mulde ein Volumen von 50 µl. Die Aushärtung erfolgte für 1 min mit einer 405 nm-Lampe und einem Abstand von 10 cm. Die vernetzten Gele wurden in einer 48-Wellplatte in jeweils 1 ml des entsprechenden Mediums im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und ca. 95 % relativer Luftfeuchtigkeit gelagert. Ein Mediumwechsel erfolgte meist einen Tag vor Messung, also an Tag 3 und Tag 6. Die Herstellung zellfreier GelMA-Gele erfolgte auf die gleiche Weise: Statt jedoch Zellen in PBS⁻ zu resuspendieren, wurde der Puffer direkt zum vorbereiteten GelMA gegeben. Nach Zugabe des Photoinitiators wurde das Gemisch wie zellbeladenes GelMA weiterverarbeitet.

GelMA-Hydrogele mit Fibronectin

Wie unter 3.2.2.2 beschrieben, wurden eine 10 % (m/v) GelMA-Stammlösung und eine 1 % (m/v) LAP-Stammlösung vor der Gelherstellung angesetzt. Es wurden 8 %, 7 % und 6 % (m/v) GelMA Gele mit 25 und 75 µg/ml Fibronectin hergestellt. Der Herstellungsprozess erfolgte wie beschrieben mit dem Unterschied, dass 25 µl bzw. 75 µl des PBS⁻ zum Resuspendieren der Zellen eingespart wurden. Stattdessen wurden 25 µl bzw. 75 µl einer 1 mg/ml Fibronectinlösung zum vorbereiteten GelMA gegeben und das Reaktionsgefäß 6 s gevortext. Die resuspendierten Zellen wurden in die GelMA-Fibronectin-Suspension pipettiert und mit einer Direktverdrängungspipette vermischt; danach wurden unter Lichtausschluss 100 µl LAP hinzugefügt und die Biotinte erneut resuspendiert. Der anschließende Herstellungsprozess glich der Herstellung der GelMA-Hydrogelen ohne Zusätze.

GelMA-Hydrogele mit Kollagen

Wie unter 3.2.2.2 beschrieben, wurden eine 10 % (m/v) GelMA-Stammlösung und eine 1 % (m/v) LAP-Stammlösung vor der Gelherstellung angesetzt. Zusätzlich wurde 0,1 % Essigsäure angesetzt, um aus der 10 mg/ml Kollagenstammlösung verschieden konzentrierte Arbeitslösungen herzustellen. Des Weiteren wurde eine Neutralisationsstammlösung hergestellt, um die Polymerisation des Kollagens zu initiieren. [85] Zur Herstellung von 8 % GelMA-Gelen mit 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml und 0,5 mg/ml Kollagen wurden je 50 µl einer 2,5 mg/ml, 5 mg/ml und 10 mg/ml Kollagenarbeitslösung in 2 ml Reaktionsgefäße gegeben. Je 800 µl GelMA wurden in Reaktionsgefäßen im Wasserbad bei 37 °C bis zur Verwendung gelagert. Die Zellen wurden gelöst und zentrifugiert, sodass ein Zellpellet mit einer Anzahl von 1×10^6 Zellen verblieb. Dieses wurde in jeweils 50 µl Neutralisationslösung resuspendiert, bevor diese Zellsuspension in die jeweilige Kollagenarbeitslösung pipettiert und vermischt wurde. Das zellbeladene Kollagengemisch wurde mit einer Direktverdrängungspipette zum vorbereiteten erwärmten GelMA gegeben und vermischt. Anschließend wurden 100 µl LAP hinzugegeben und die entstandene Biotinte resuspendiert. Der weitere Ablauf gleicht der Herstellung zusatzfreier GelMA-Gele.

3.2.3 Quantifizierung des zellulären Metabolismus – WST-8-Assay

Um den zellulären Metabolismus und damit die Anzahl vitaler Zellen zu bestimmen, wurde das Cell Counting Kit-8 verwendet. Das darin enthaltene WST-8, ein Tetrazoliumsalz, wird von zellulären Dehydrogenasen vitaler Zellen zum Produkt Formazan

reduziert, welches durch einen orangefarbenen Farbumschlag sichtbar wird. Dieser ist proportional zur Anzahl lebender Zellen und wird bei einer Absorption von 450 nm in einem *microplate reader* gemessen. [86] Die Bestimmung des zellulären Metabolismus in den Hydrogelen wurde an den Versuchstagen 1, 4 und 7 durchgeführt. Zunächst wurden die Hydrogele zweimal für 10 min in PBS⁻ (GelMA-Gele) bzw. PBS⁺ (AlgGel-Gele; um deren Auflösung zu verhindern) auf dem Schüttler gewaschen. Anschließend wurden die Gele abgetupft und gewogen, um das Feuchtgewicht zu bestimmen. Die Gele wurden jeweils in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und auf 250 µl, inklusive Probenvolumen, mit Zellkulturmedium aufgefüllt, sodass die Gele vollständig im Medium lagen. Ebenso wurden Leerwertmessungen mit einem Volumen von 250 µl Zellkulturmedium vorbereitet. Zu allen Proben und Leerwerten wurden je 2,5 µl WST-8-Reagenz pipettiert und diese anschließend im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit für 3 bis 4 h inkubiert. Die Absorptionsmessung im *microplate reader* erfolgte im Anschluss, indem von jeder Probe und jedem Leerwert Duplikate von 100 µl in eine 96-Wellplatte pipettiert wurden. Entstandene Luftblasen wurden im Voraus mit einer Kanüle eröffnet. Die Absorption wurde bei einer optischen Dichte von 450 nm (OD₄₅₀) mit einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen. Durch Subtraktion des Hintergrundsignals und des Leerwerts wurde zuletzt die optische Dichte der Probe berechnet, welche proportional zum zellulären Metabolismus und damit zur Menge vitaler Zellen ist.

3.2.4 Quantifizierung des zellulären DNA-Gehalts – PicoGreen-Assay

Die Quantifizierung der zellulären DNA wurde mithilfe des Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay-Kits durchgeführt. Das dazugehörige dsDNA-Reagenz ist ein hochempfindlicher, fluoreszierender Farbstoff, welcher an doppelsträngige DNA bindet. [87] Diese Fluoreszenz konnte bei 485 nm Wellenlänge fluorometrisch mithilfe des *microplate readers* ermittelt werden. Sie ist proportional zum DNA-Gehalt, welcher über eine zeitgleich angesetzte und gemessene DNA-Standardreihe berechnet wird. Der Fluoreszenz-Messung stand der Papainase-Verdau der Hydrogele zuvor, welcher im direkten Anschluss an den WST-8-Assay durchgeführt wurde. Zunächst wurden die Gele zweimal für jeweils 10 min auf dem Schüttler gewaschen – GelMA-Gele in 1 ml PBS⁻, AlgGel-Gele in PBS⁺. Die Gele wurden in einem nächsten Schritt trocken getupft und in neue 2 ml-Reaktionsgefäße überführt. Zu den Hydrogelen wurden nun je 125 µl Cystein/PBE-Puffer (0,85 mg/ml Cystein) gegeben, sowie 125 µl 60 U / 10 ml Papainase-Lösung verdünnt in Cystein/PBE-Puffer. Es wurde darauf geachtet, dass die Hydrogele vollständig in Lösung liegen, um einen Verdau sicherzustellen. Die Proben wurden bei 60 °C im

Thermomixer bei 0 rpm für mindestens 10 h inkubiert. Erst später benötigte Proben wurden bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren. Der Verdau der Hydrogele wurde immer im Anschluss an die letzte Messung des WST-8-Assays durchgeführt. Für den PicoGreen-Assay selbst wurden eingefrorene Proben und das PicoGreen-Reagenz aufgetaut und anschließend, ebenso wie frische Proben, auf Eis gelagert. Es wurde ein 1x TE-Puffer vorbereitet. Weiterhin wurde eine 2 µg/ml konzentrierte DNA-Stammlösung aus 100 µg/ml λ-DNA-Standard und PBE/Cystein-Puffer hergestellt. Zuletzt wurde eine 1:200 verdünnte Gebrauchslösung des PicoGreen-Reagenz in 1x TE-Puffer vorbereitet. DNA-Stammlösung und PicoGreen-Reagenz wurden auf Eis gelagert und letzteres zusätzlich vor Licht geschützt. Die High-Range DNA-Standardreihe und der Standardblank wurden im Anschluss aus DNA-Stammlösung und Cystein/PBE-Puffer nach folgendem Pipettierschema hergestellt (siehe Tabelle 11) und bis zur Verwendung auf Eis gelagert:

Tabelle 11: Pipettierschema der High-Range Standardreihe des PicoGreen-Assays.

Standard	DNA-Konzentration [ng/ml]	2 µg/ml DNA-Stammlösung [µl]	Cystein/PBE-Puffer [µl]
A	1000	300	0
B	800	280	70
C	600	210	140
D	400	140	210
E	200	70	280
F	100	35	315
G	10	4	396
H	1	35 (aus G)	315
Standardblank	0	0	300

Die Proben, DNA-Standardreihe und der Standardblank wurden in Duplikaten in eine schwarze 96-Wellplatte pipettiert. Um eine 1:8-Verdünnung der Proben zu erreichen, wurden zunächst 87,5 µl Cystein/PBE-Puffer und anschließend 12,5 µl der zuvor gevortexten Probe in jedes Well gegeben. Die DNA-Standardreihe und der Standardblank wurden gevortext und zu je 100 µl in Duplikaten pipettiert. Zum Schluss wurde mit einer Mehrkanalpipette jeweils 100 µl PicoGreen-Reagenz-Gebrauchslösung in jedes Well pipettiert und die Platte anschließend lichtgeschützt für 2 min auf dem Schüttler inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte anschließend im *micoplate reader* bei einer Anregung von 485 nm und einer Emission von 535 nm. Der DNA-Gehalt wurde anhand der

Fluoreszenzwerte und der DNA-Standardkurve berechnet und weiterhin der absolute DNA-Gehalt nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{absoluter DNA Gehalt [ng]} = \text{DNA} \left[\frac{\text{ng}}{\text{ml}} \right] * \text{Verdünnungsfaktor} * (0,25\text{ml} + \text{Gewicht des Gels})$$

3.2.5 Beurteilung der zellulären Vitalität – Live/Dead-Assay

Eine Beurteilung der zellulären Vitalität in den Hydrogelen erfolgte durch Färbung der Zellen. Dafür wurden Calcein AM (1mg/ml) und Ethidium-Homodimer 1 (EthD-1; 2 mM) wie unten erläutert eingesetzt. Calcein AM wird in lebenden Zellen durch Esterasen hydrolysiert und es entsteht das grün fluoreszierende Calcein. [88] EthD-1 ist ein rot fluoreszierender Farbstoff, der beschädigte Zellmembranen durchqueren kann und anschließend an dsDNA bindet. [89] Die Fluoreszenz wurde anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop detektiert. Es wurden jeweils zwei Gele an den Versuchstagen 1, 4 und 7 analysiert. Dafür wurden die Gele zunächst zweimal für je 10 min in jeweils 1 ml PBS⁻, bzw. AlgGel-Gele in PBS⁺ gewaschen. Von einer angesetzten Färbelösung, bestehend aus 2 µl Calcein AM und 0,5 µl EthD-1 auf 1 ml PBS^{-/+}, wurden zu jedem Gel 300 µl pipettiert, sodass dieses vollständig bedeckt war. Nach einer Inkubation der Wellplatte im Inkubator bei 37 °C für 30 bis 40 min, wurden die Gele erneut gewaschen und anschließend bis zur Verwendung dunkel in PBS^{-/+} gelagert. Die Hydrogele wurden, in einer Glasbodenschale liegend, mit dem inversen Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert und die Einstellungen so gewählt, dass das Hintergrundsignal für Calcein (Extinktion: 495 nm, Emission: 515 nm) und EthD-1 (Extinktion: 528 nm, Emission: 617 nm) möglichst gering ausfiel. Es wurden repräsentative Aufnahmen mit 10x- und 20x-Vergrößerung von der Ober- und Unterseite, sowie aus der Mitte angefertigt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit der Software ImageJ2 (Version: 2.3.0/1.53f).

3.2.6 Bestimmung physikalischer und mechanischer Eigenschaften von GelMA-Hydrogelen

Es wurden physikalische und mechanische Eigenschaften zellfreier GelMA-Hydrogele mit einer Konzentration von 8 %, 7 % und 6 % (m/v) GelMA und einer Größe von 6 x 1 mm und 4 x 4 mm (Durchmesser x Höhe) bestimmt. Die Gele wurden über die Versuchstage hinweg in je 1 ml Zellkulturmedium für BCS-Zellen gelagert, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Der Mediumwechsel erfolgte an Versuchstag 3 und 6.

3.2.6.1 Quantifizierung der Quellung von GelMA-Hydrogelen

Um eine Aussage zum physikalischen Quellverhalten der GelMA-Gele treffen zu können, wurden pro Konzentration fünf Gele mit einer Größe von 6 x 1 mm (Durchmesser x Höhe) hergestellt, welche über den Verlauf des Versuchs in Zellkulturmedium im Inkubator bei 37 °C gelagert wurden. Sie wurden an den Versuchstagen 0 – nach 1,5 h und ein weiteres Mal nach 3 h – 1, 4 und 7 gewogen. Dafür wurden die Gele abgetupft und anschließend das Feuchtgewicht bestimmt. Nach der Messung wurden sie wieder in Medium inkubiert.

3.2.6.2 Bestimmung des E-Moduls der GelMA-Hydrogele

Zur Bestimmung des E-Moduls wurden zylindrische Probekörper mit einem Durchmesser von 4 mm und einer Höhe von ebenfalls 4 mm hergestellt. Diese Probekörper wurden für Kompressionsversuche mit dem Prüfgerät *ElectroForce 5500* (Bose) eingesetzt. Pro Bedingung wurden fünf Gele hergestellt, die bis zur Messung in BCS-Zellkulturmedium gelagert wurden, welche im Anschluss an die Herstellung aller Gele erfolgte. Zuerst wurden Höhe und Durchmesser der Gele bestimmt. Für die anschließende Messung mit dem Prüfgerät *ElectroForce 5500* wurde jedes Gel 1 mm verformt, was einer Kompression von etwa 20 % entspricht. Für jeden Messpunkt wurde die Verformung und die entsprechende Kraft aufgezeichnet. Die Kompression wurde anhand folgender Formel bestimmt:

$$\text{Kompression [\%]} = \frac{\text{Verformung [mm]}}{\text{Höhe [mm]}}$$

Die Spannung wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Spannung [kPa]} = \frac{1000 * (\text{Kraft [N]} * (\text{Höhe [mm]} - \text{Verformung [mm]})}{((\text{Durchmesser [mm]}/2)^2) * \pi * \text{Höhe [mm]}}$$

Spannung und Kompression eines jeden Messpunktes wurden ins Verhältnis gesetzt und in einem Graphen dargestellt. Für diesen wurde die lineare Trendlinie bestimmt, deren Steigung dem E-Modul des gemessenen Gels entspricht.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche: Auswirkung der Seren BCS und FCS auf NIH-3T3-Zellen

In vorliegender Arbeit wurde die Mausfibroblasten-Zelllinie NIH-3T3 verwendet. Die Auswirkung der Seren BCS und FCS auf zwei unterschiedliche Zellkulturen derselben Zelllinie wurde in Vorversuchen evaluiert, um für die nachfolgenden Versuche das Serum ausfindig zu machen, welches den Zellmetabolismus und die Proliferation dieser am besten unterstützt. Weiterhin wurde so der Umgang mit Hydrogelen und Zellen erlernt. Die NIH-3T3-Zellen wurden für diesen Vergleich in unterschiedliche Hydrogel-Systeme eingebettet. Zunächst wurden Vorversuche mit dem am FMZ etablierten Hydrogel-System AlgGel durchgeführt. Im Anschluss daran folgten Vorversuche mit dem Bioharz GelMA.

4.1.1 NIH-3T3 in AlgGel-Hydrogelen

Die AlgGel-Gele wurden, wie unter 3.2.2.1 beschrieben, mit einer Konzentration von 2 % (m/v) Alginat und 10 % (m/v) Gelatine in Anlehnung an das Protokoll von Wüst *et al.* 2014 synthetisiert. [34] Dabei wurden einerseits Hydrogele, welche an BCS adaptierte NIH-3T3-Zellen enthielten, hergestellt und andererseits solche, die mit an FCS adaptierten NIH-3T3-Zellen beladen waren. Die Zelldichte betrug 5×10^6 Zellen pro ml Hydrogel. Dies entsprach bei einem Volumen von 30 μ l Gel einer initialen Zellzahl von 150.000 an Tag 0. Ihrer Gewöhnung entsprechend, wurden die zellbeladenen AlgGel-Gele mit BCS oder FCS inkubiert. Eine Beurteilung der Zellen erfolgte an den Tagen 1, 4 und 7. Dabei wurden anhand des CCK-8- und des PicoGreen-Assays an diesen Tagen je drei Hydrogele auf den Zellmetabolismus und die Proliferation hin analysiert. Es wurden mehrere Versuchsläufe durchgeführt. Nachfolgend werden repräsentative Graphen der erhaltenen Trends für einen Versuchsdurchlauf gezeigt. Die Ergebnisse des Versuchsdurchlaufs B können dem Anhang entnommen werden (siehe Abbildung 24 und Abbildung 25).

Metabolismus

Wie in Abbildung 6 zu erkennen, ist die zelluläre Stoffwechselaktivität an Tag 7 in beiden Versuchsgruppen geringer als an Tag 1. Jedoch unterscheidet sich der Verlauf des Metabolismus in beiden Gruppen. An BCS gewöhnte NIH-3T3-Zellen zeigen zunächst einen geringen Anstieg ihres Metabolismus bis Tag 4, welcher im Anschluss abnimmt, wohingegen die Aktivität, der an FCS gewöhnten Zellen direkt sinkt. Auch insgesamt ist die Abnahme des Metabolismus von FCS-adaptierten Zellen etwa dreimal so groß wie die von BCS-gewöhnten Zellen.

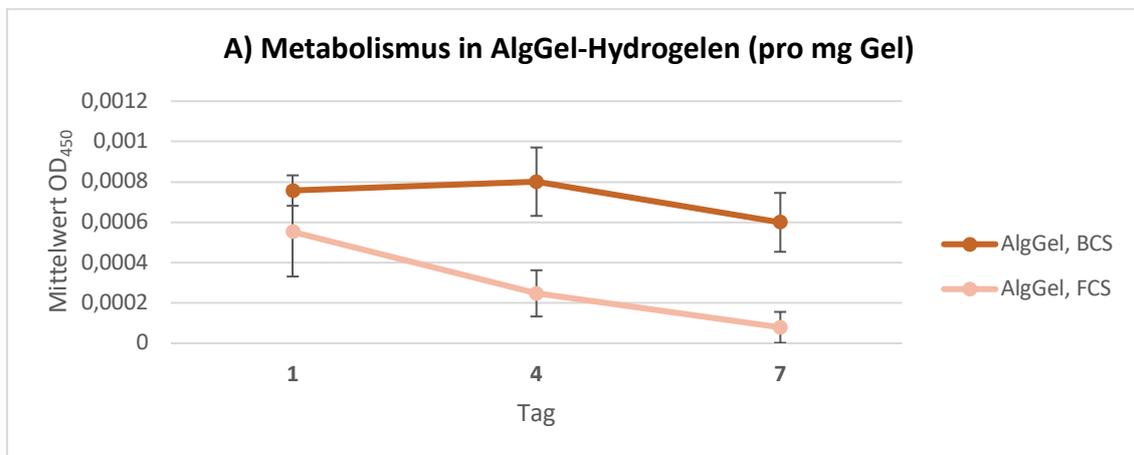


Abbildung 6: Metabolismus pro mg Gel von NIH-3T3-BCS und -FCS-Zellen in AlgGel-Hydrogelen (Durchlauf A). Messung mittels CCK-8-Kit an den Versuchstagen 1, 4 und 7. Mittelwert \pm Standardabweichung; $n = 6$.

DNA-Gehalt

In Abbildung 7 ist zu erkennen, dass der absolute DNA-Gehalt an Tag 7 in beiden Versuchsgruppen ebenfalls geringer ist als an Tag 1. Jedoch unterscheiden sich auch hier die Verläufe beider Versuchsgruppen. Die Stoffwechselaktivität der an BCS gewöhnten NIH-3T3-Zellen nimmt, nach einer anfänglichen Abnahme von Tag 1 bis Tag 4, bis Tag 7 wieder geringfügig zu, wohingegen die der an FCS gewöhnten Zellen auch nach Tag 4 weiterhin sinkt. Insgesamt ist hier die Abnahme des DNA-Gehalts in Gelen mit FCS-adaptierten Zellen fast doppelt so groß wie die von Gelen mit an BCS-gewöhnten Fibroblasten. Beide Messungen deuten somit daraufhin, dass sich BCS als additives Serum für die Kultivierung von NIH-3T3-Fibroblasten in AlgGel-Gelen besser eignet.

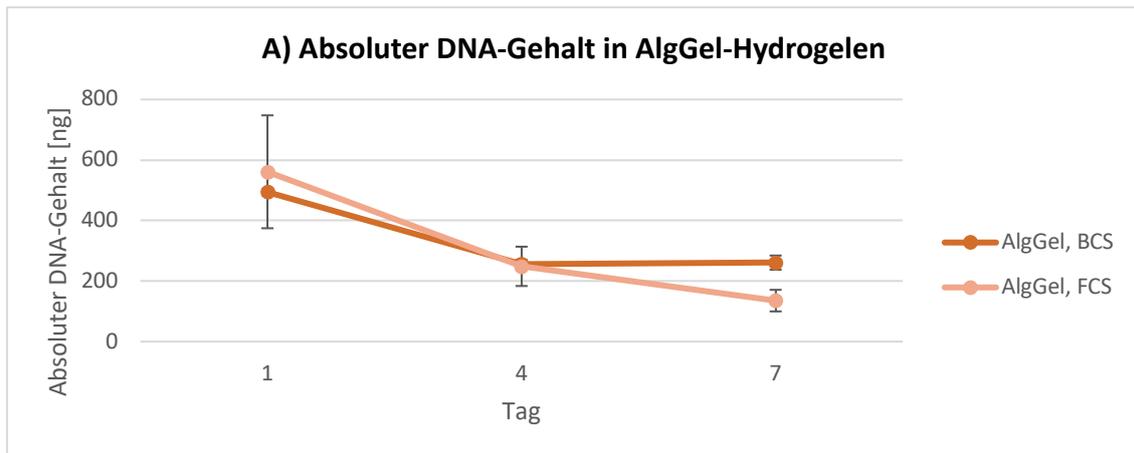


Abbildung 7: Absoluter DNA-Gehalt [ng] von NIH-3T3-BCS und -FCS-Zellen in AlgGel-Hydrogelen (Durchlauf A). Messung mittels PicoGreen (Probenverdünnung 1:8) an den Versuchstagen 1, 4 und 7. Mittelwert \pm Standardabweichung; $n = 6$.

4.1.2 NIH-3T3-Zellen in GelMA-Hydrogelen

Die GelMA-Gele wurden wie unter 3.2.2.2 beschrieben hergestellt und enthielten eine Endkonzentration von 8 % (m/v) CG-130-GelMA. Es wurden ebenfalls Hydrogele hergestellt, welche an BCS adaptierte NIH-3T3-Fibroblasten enthielten und solche mit an FCS adaptierten NIH-3T3-Fibroblasten. Die Zelldichte in diesen Gelen war kleiner als in AlgGel-Gelen und betrug 1×10^6 Zellen pro ml Hydrogel. Dies entsprach einer initialen Zelldichte von 30.000 Zellen je gegossenem 30 μ l-Gel. In Abhängigkeit von der Gewöhnung der Zellen, wurden sie ebenfalls mit BCS oder FCS inkubiert. Eine Beurteilung der Zellen erfolgte an den Tagen 1, 4 und 7 mittels CCK-8- und PicoGreen-Assay anhand von je drei Hydrogelen. Es wurden mehrere Versuchsläufe durchgeführt. Nachfolgend werden repräsentative Graphen der erhaltenen Trends für einen Versuchsdurchlauf gezeigt. Die Ergebnisse weiterer Versuchsdurchläufe können dem Anhang entnommen werden (siehe Abbildung 26 und Abbildung 27).

Metabolismus

Abbildung 8 zeigt, dass die metabolische Aktivität der an BCS gewöhnten NIH-3T3-Zellen bis Tag 7 ansteigt. Dabei ist die Zunahme bis Tag 4 zunächst nur mäßig, im Anschluss dann aber stark ausgeprägt. Insgesamt ist die Zunahme des Stoffwechsels von BCS-adaptierten Zellen etwa um den Faktor 25 größer als der Anstieg des Metabolismus von FCS-adaptierten Zellen, welcher fast konstant auf dem Niveau des Ausgangswertes bleibt und kaum merklich ansteigt. Weiterhin zeichnen sich die Messwerte der an BCS gewöhnten Zellen an Tag 7 durch hohe Standardabweichungen aus.

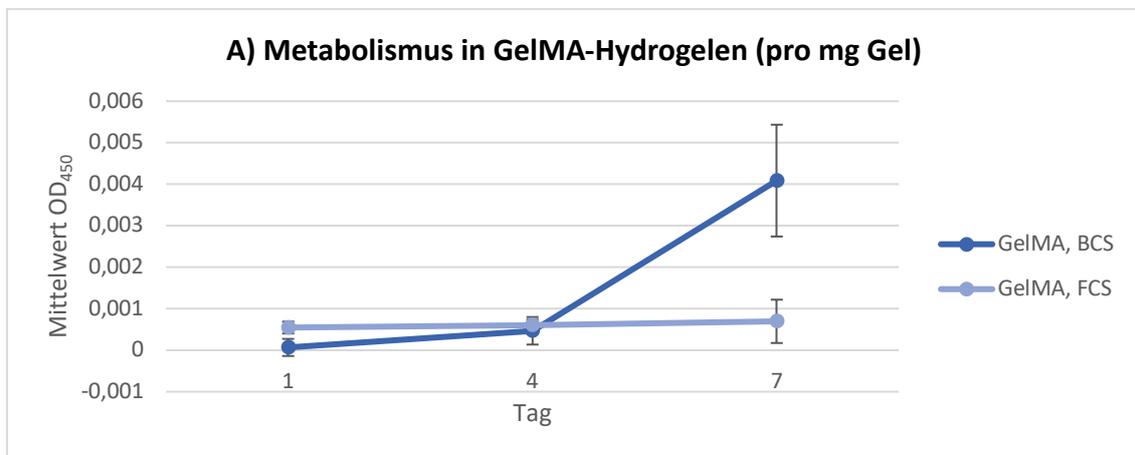


Abbildung 8: Metabolismus pro mg Gel von NIH-3T3-BCS und -FCS-Zellen in 8 % GelMA-Hydrogelen (Durchlauf A). Messung mittels CCK-8-Kit an den Versuchstagen 1, 4 und 7. Mittelwert \pm Standardabweichung; $n = 6$.

DNA-Gehalt

Wie in Abbildung 9 zu erkennen, steigt auch der absolute DNA-Gehalt, welcher in GelMA-Hydrogelen mit an BCS adaptierten Zellen gemessen wurde bis Tag 7 um etwa das Fünffache im Vergleich zum Ausgangswert an. Hingegen steigt der Gehalt in den Hydrogelen mit an FCS gewöhnten Zellen erst nur geringfügig, bevor er auf einen Wert absinkt, der sogar noch kleiner ist als der Ausgangswert. Somit beträgt der DNA-Gehalt in FCS-supplementierter Hydrogel-Kultur nur noch etwa 90 % der ursprünglichen DNA-Menge.

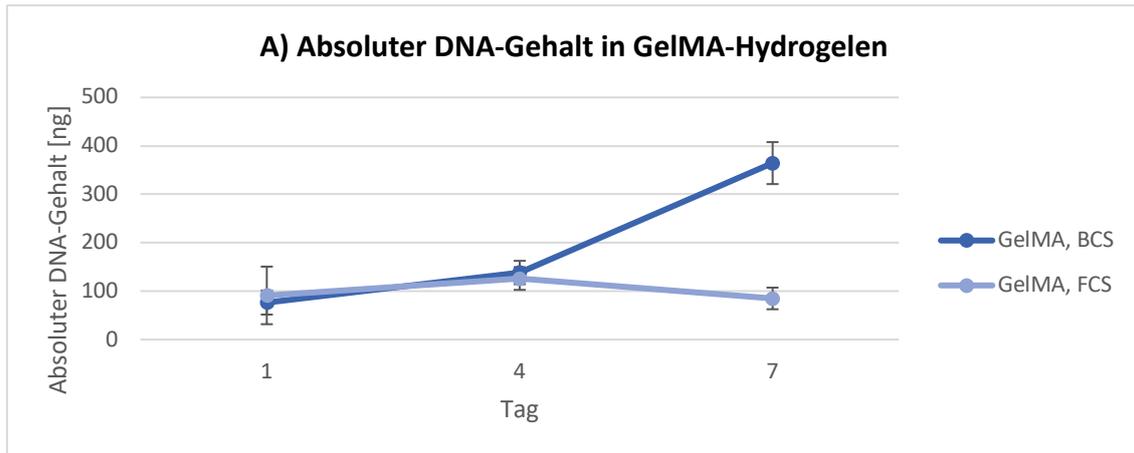


Abbildung 9: Absoluter DNA-Gehalt [ng] von NIH-3T3-BCS und -FCS-Zellen in 8 % GelMA-Hydrogelen (Durchlauf A). Messung mittels PicoGreen (Probenverdünnung 1:8) an den Versuchstagen 1, 4 und 7. Mittelwert \pm Standardabweichung; $n = 6$.

4.2 GelMA-Hydrogele: Auswirkung verschiedener *Batches* auf NIH-3T3-Zellen

Wie in 3.2.2.2 beschrieben, wurden für mehrere aufeinanderfolgende Versuchsreihen GelMA-Hydrogele mit 8 % (m/v) GelMA hergestellt, welche an BCS gewöhnte NIH-3T3-Fibroblasten enthielten. Dafür wurden zwei GelMA-*Batches* mit unterschiedlichem Molekulargewicht gewählt. Für den *Batch* CG-130 wurde von Csaba Gergely, Doktorand am FMZ in Würzburg, ein Molekulargewicht von 392 kDa gemessen, für den *Batch* CG-M ein Molekulargewicht von nur 92 kDa. Die Polydispersität des *Batches* CG-130 betrug 3,4 und jene des *Batches* CG-M lag bei 1,2. Die an Tag 1, 4 und 7 gemessenen DNA-Werte mehrerer Versuchsdurchläufe beider *Batches* wurden gemittelt und graphisch gegeneinander dargestellt, um zu vergleichen, welcher *Batch* die Proliferation der Zellen besser unterstützt. Dabei ist in Abbildung 10 zu erkennen, dass der absolute DNA-Gehalt beider Hydrogele an Tag 1 sehr ähnlich ist und sich bis Tag 4 kaum verändert. Erst an Tag 7 ist ein deutlicher Unterschied zwischen beiden *Batches* zu erkennen, wengleich hier die hohen Standardabweichungen beachtet werden müssen: In Gelen des *Batches* CG-M steigt der DNA-Gehalt auf etwa 390 % der ursprünglichen Menge und fällt damit über alle Proben deutlicher aus als im *Batch* CG-130, in welchem ein Anstieg der DNA auf etwa 320 % zu verzeichnen ist. Daraus lässt sich schließen, dass Zellen in CG-M-GelMA besser proliferierten als in CG-130-GelMA.

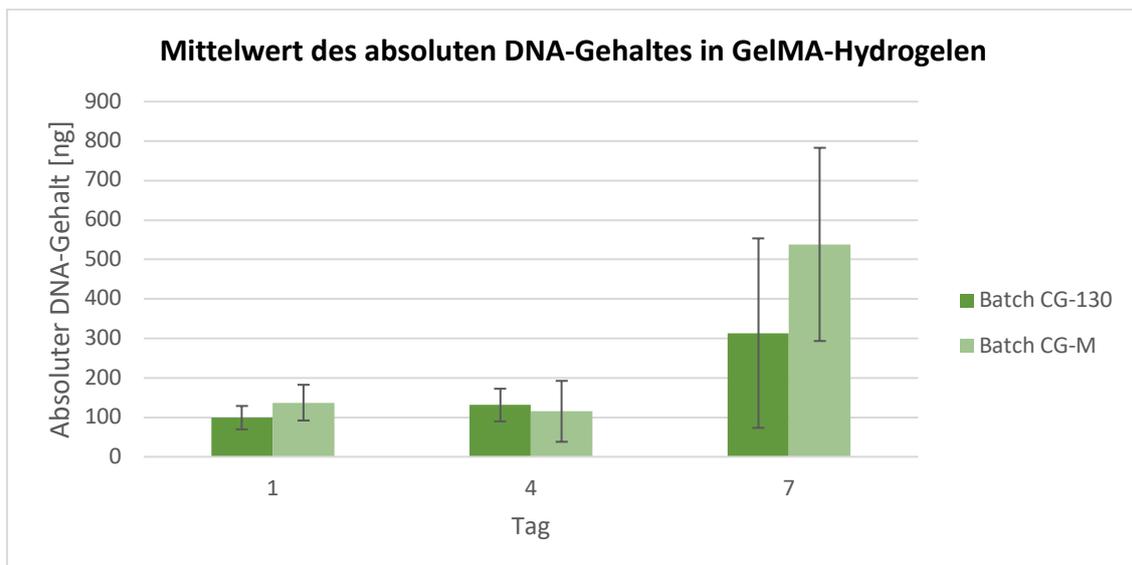


Abbildung 10: Mittelwert des absoluten DNA-Gehaltes [ng] von NIH-3T3-BCS-Zellen in 8 % GelMA-Hydrogelen der Batches CG-130 und CG-M. Messung mittels PicoGreen (Probenverdünnung 1:8) an den Versuchstagen 1, 4 und 7. Gemittelter DNA-Gehalt aus mehreren Versuchsdurchläufen. Mittelwert \pm Standardabweichung; n (CG-130) \geq 6; n (CG-M) = 6.

4.3 Zellfreie GelMA-Hydrogele: Physikalische und mechanische Eigenschaften verschiedener GelMA-Konzentrationen

Es wurden physikalische und mechanische Eigenschaften von GelMA-Hydrogelen unterschiedlicher Konzentrationen (8, 7 und 6 % (m/v) CG-130-GelMA) bestimmt, um einen möglichen Einfluss dieser auf eingebettete Zellen zu erkennen. Dafür wurden zellfreie Probekörper, wie unter 3.2.2.2 beschrieben, hergestellt.

4.3.1 Quellung

Für die Beurteilung des Quellverhaltens wurden Probekörper der Dimension 6 x 1 mm gegossen und das Feuchtwicht (mg) dieser bestimmt. Die erste Messung fand an Tag 0 (1,5 h nach Herstellung) und weiterhin an den Tagen 1, 4 und 7 statt, um eine mögliche Gewichtsänderung im zeitlichen Verlauf über eine Woche zu erfassen, welche auf die eingebetteten Zellen Einfluss genommen haben könnte. Dabei ist in Abbildung 11 zu erkennen, dass das prozentuale Feuchtwicht aller Gelkonzentrationen von Tag 0 bis 1 deutlich abnimmt. Im Anschluss daran erfolgt zwar weiterhin eine kontinuierliche Abnahme des anteiligen Feuchtwichts, jedoch nur noch in sehr geringem Ausmaß. Dies weist auf den Eintritt in das *equilibrium swelling state* bereits nach 24 h hin, wodurch ein Einfluss der Gewichtsabnahme auf die Zellen im weiteren Messverlauf vernachlässigt werden kann. Weiterhin ist zu erkennen, dass das Feuchtwicht der 6 % Gele insgesamt am wenigsten und jenes der 8 % Gele am meisten sinkt. So erreichen 6 % GelMA-Hydrogele an Tag 7 noch ein anteiliges Gewicht von $78,3 \pm 1,1$ %, wohingegen 8 % Gele nur noch $70,7 \pm 5,5$ % erzielen.

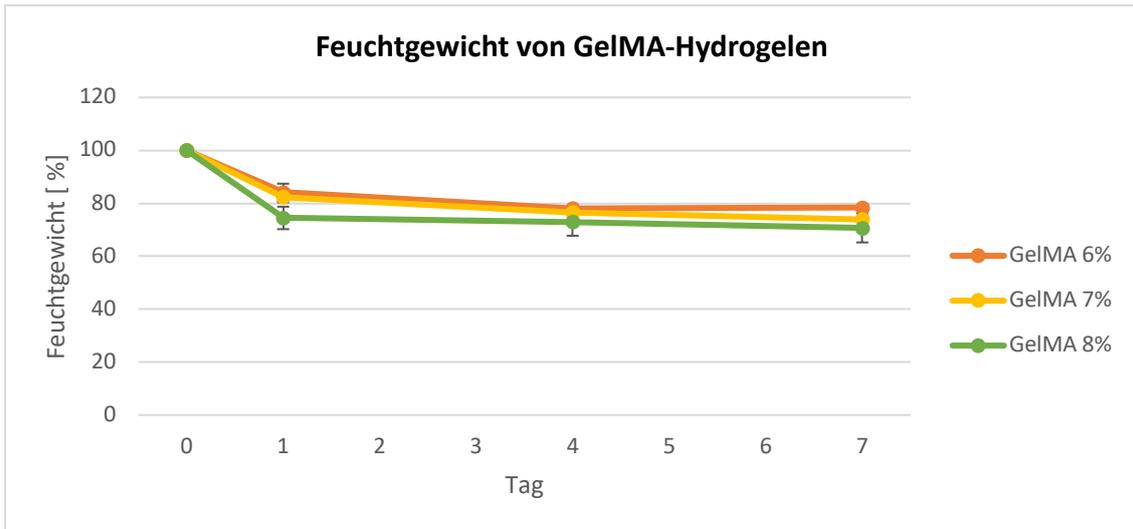


Abbildung 11: Feuchtgewicht von zellfreien GelMA-Hydrogelen der Konzentrationen 6, 7 und 8 %. Prozentuales Feuchtgewicht an den Versuchstagen 0, 1, 4 und 7. Messung des Feuchtgewichts mittels Waage in mg. Mittelwert \pm Standardabweichung; $n = 5$.

4.3.2 E-Modul

Der E-Modul wurde mit Probekörpern der Größe 4 x 4 mm nach Herstellung dieser, wie unter 3.2.6.2 beschrieben, bestimmt. Dabei ist in Abbildung 12 zu erkennen, dass der E-Modul und damit die Steifigkeit zwischen den GelMA-Konzentrationen variiert und mit steigender Konzentration gleichmäßig um etwa 2,5 kPa je 1 % Zunahme der GelMA-Konzentration zunimmt. Demnach weisen 6 % Gele einen E-Modul von $5 \pm 1,6$ kPa, 7 % Gele einen von $7,6 \pm 1,7$ kPa und 8 % Hydrogele einen von $10,4 \pm 1,7$ kPa auf, womit 8 % Gele am steifsten sind.

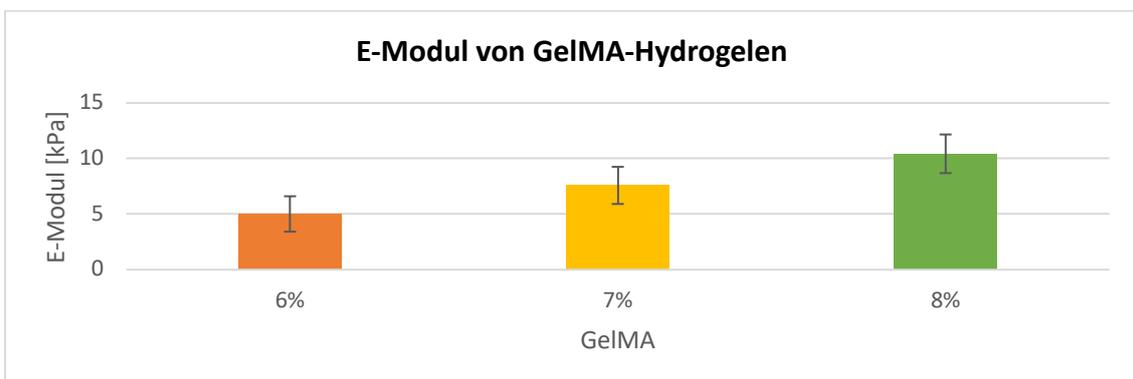


Abbildung 12: E-Modul von zellfreien GelMA-Hydrogelen der Konzentrationen 6, 7 und 8 %. E-Modul von 4 x 4 mm Probekörpern. Messung mittels ElectroForce 5500 nach Herstellung. Mittelwert \pm Standardabweichung; $n = 1$

4.4 GelMA-Hydrogele: Auswirkung verschiedener GelMA-Konzentrationen auf NIH-3T3-Zellen

Wie unter 3.2.2.2 beschrieben, wurden Hydrogele mit einer Konzentration von 8, 7 und 6 % (m/v) CG-130-GelMA hergestellt, um einen möglichen Effekt der GelMA-Konzentration auf die eingebetteten Zellen zu erkennen. Alle folgenden Versuche wurden auf Grund der besseren Werte hinsichtlich Metabolismus und Proliferation mit NIH-3T3-Fibroblasten, welche an BCS gewöhnt waren, durchgeführt und die Zelldichte betrug weiterhin 1×10^6 Zellen pro ml Hydrogel, entsprechend einer Zelldichte von 30.000 pro gegossenem 30 μ l-Gel. An den Versuchstagen 1, 4 und 7 wurden mittels CCK-8- und PicoGreen-Assay anhand mehrerer Hydrogele der Metabolismus und die Proliferation gemessen. Zusätzlich wurde die Vitalität unter dem Fluoreszenzmikroskop mittels Live/Dead-Assay beurteilt. Es wurden drei unabhängige Versuchsdurchläufe durchgeführt.

Metabolismus

Wie in Abbildung 13 zu erkennen, steigt der Metabolismus in allen drei Konzentrationsgruppen an Tag 7 deutlich an. An Tag 4 ist hingegen meist ein nur sehr geringer Anstieg der Messwerte zu erkennen, vereinzelt auch eine Abnahme dieser. Die drei Versuchsdurchläufe (A bis C) zeigen unterschiedliche Ausprägungen der Zunahme des Metabolismus an Tag 7. So steigt bspw. in Durchlauf A und B der Stoffwechsel in 6 % Gelen um etwa das Elffache an, womit die Zunahme größer ist als in den höher konzentrierten Gelen. Hingegen ist im Durchlauf C der nur Fünffache Anstieg des Stoffwechsels in 6 % Gelen im Vergleich zu den höher konzentrierten Gelen am geringsten. Weiterhin zeichnen sich v.a. die Messwerte an Tag 7 durch hohe Standardabweichungen aus. Wenngleich somit anhand der Versuchsdurchläufe keine Aussage darüber getroffen werden kann, welche der drei GelMA-Konzentrationen die Stoffwechselaktivität am besten unterstützt, eignen sich dennoch alle dafür, den Zellmetabolismus zu erhalten.

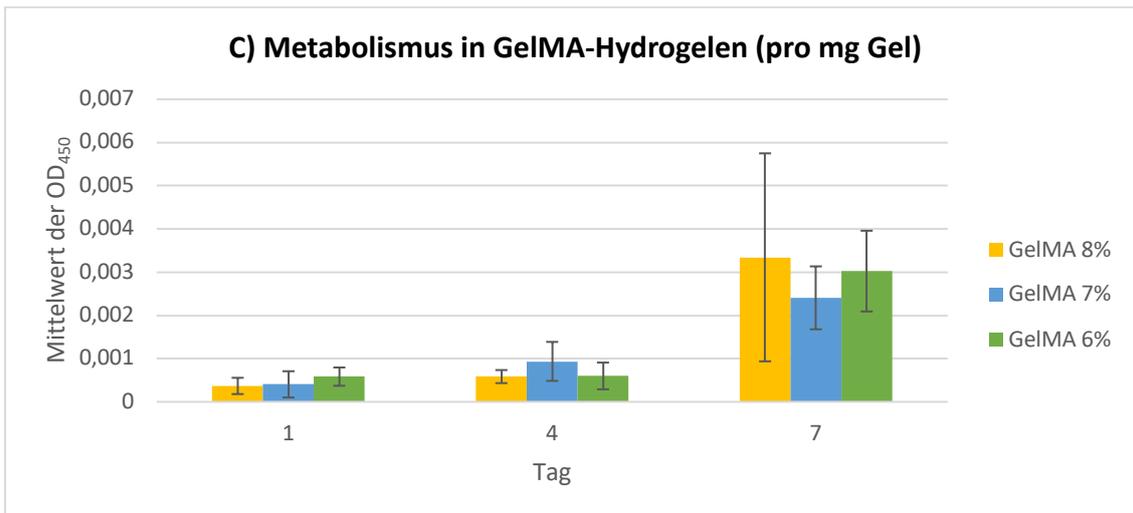
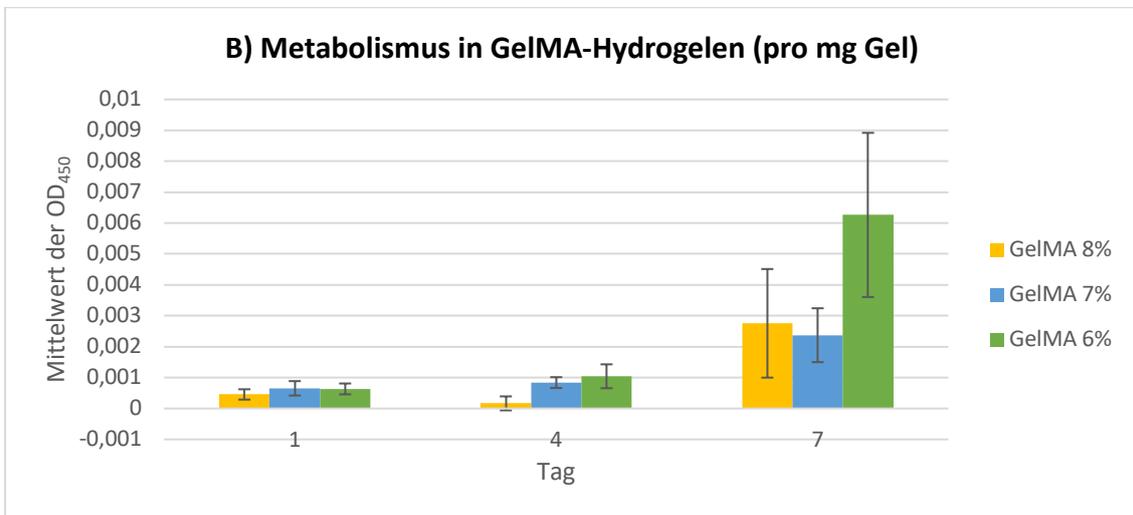
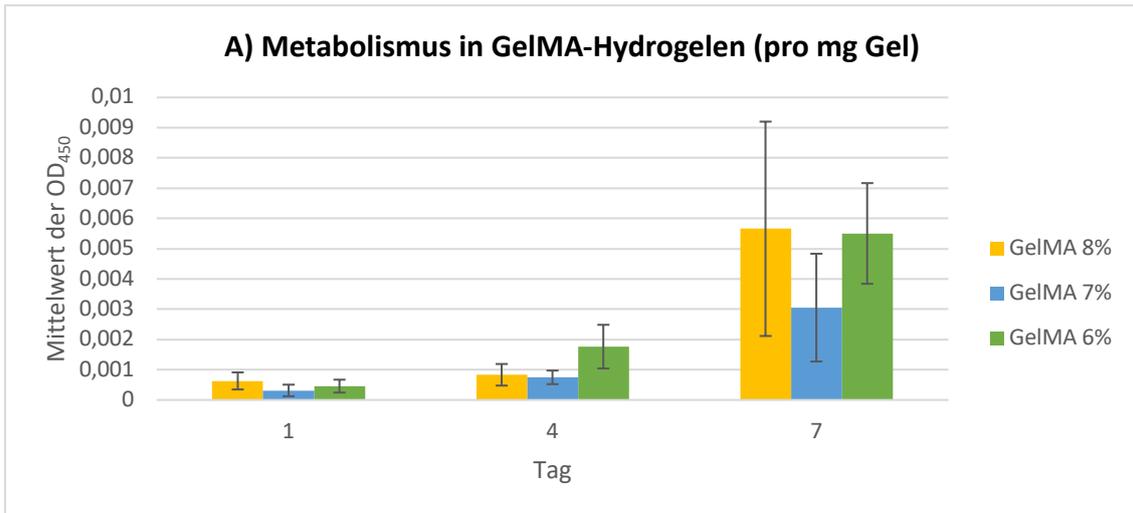


Abbildung 13: Metabolismus pro mg Gel von NIH-3T3-BCS-Zellen in 8, 7 und 6 % GelMA-Hydrogelen (Durchlauf A bis C). Messung mittels CCK-8-Kit an den Versuchstagen 1, 4 und 7. Mittelwert \pm Standardabweichung; $n = 6$.

DNA-Gehalt

In Abbildung 14 ist der Verlauf des DNA-Gehalts in Abhängigkeit von der GelMA-Konzentration zu erkennen. An Tag 7 zeigt sich in allen Konzentrationen und Durchläufen eine Zunahme des absoluten DNA-Gehalts in den Hydrogelen. Hingegen sind an Tag 4 nur kleine Schwankungen des DNA-Gehalts um den Ausgangswert zu erkennen. Weiterhin lassen sich v.a. an Tag 7 große Standardabweichungen erkennen. Wenngleich sich keine Tendenz erkennen lässt, welche Konzentration die Proliferation am besten unterstützt, da sich bspw. die Zunahme des DNA-Gehalts in Durchlauf C zwischen den Konzentrationen kaum unterscheidet, was im Gegensatz zu den anderen Durchläufen steht, lässt sich in allen Konzentrationsgruppen eine Steigerung der Zellproliferation bis Tag 7 detektieren. Dies stimmt mit den Beobachtungen aus Abbildung 13 des bis Tag 7 ansteigenden Metabolismus überein.

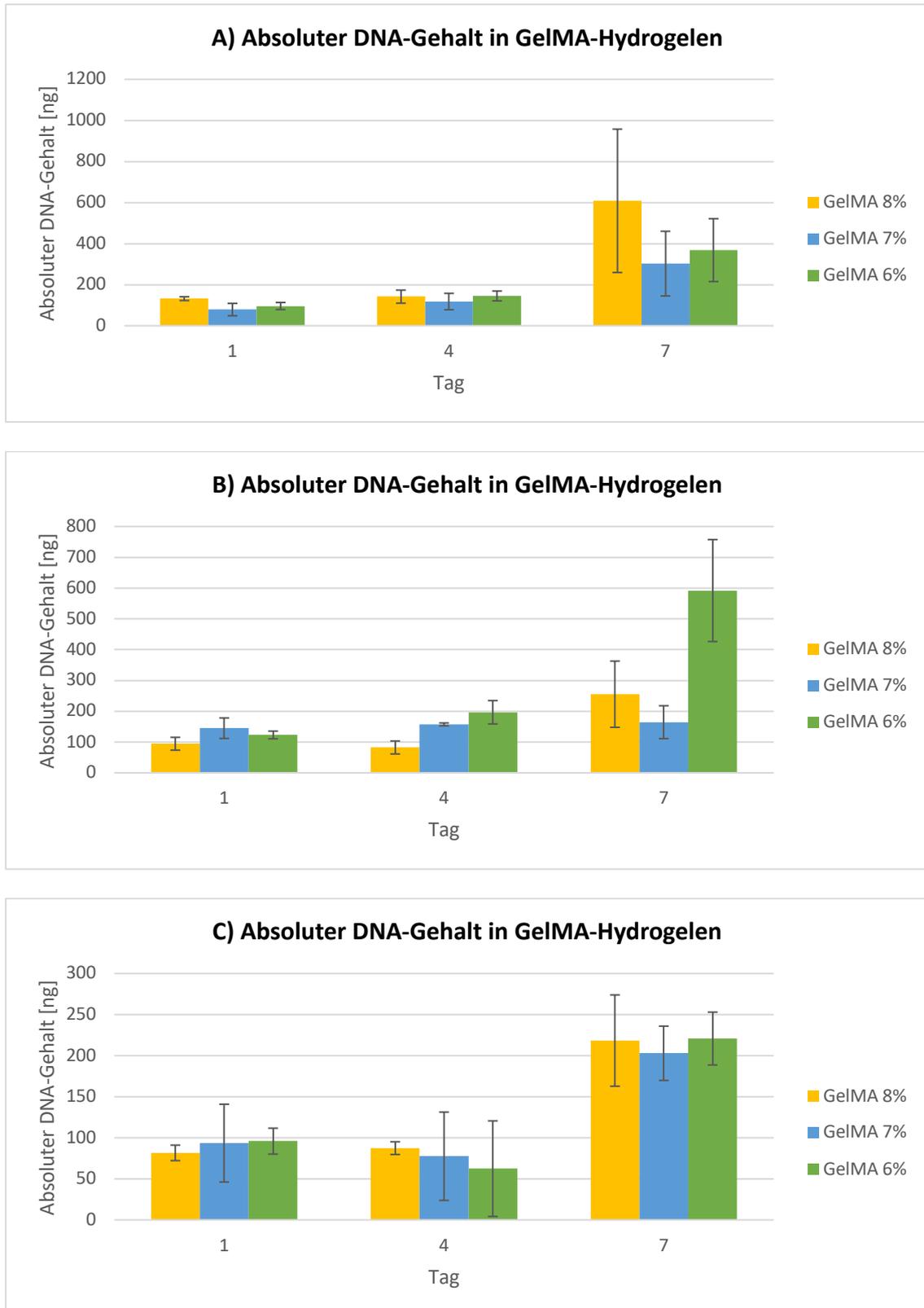


Abbildung 14: Absoluter DNA-Gehalt [ng] von NIH-3T3-BCS-Zellen in 8, 7 und 6 % GelMA-Hydrogelen (Durchlauf A bis C). Messung mittels PicoGreen (Probenverdünnung 1:8) an den Versuchstagen 1, 4 und 7. Mittelwert \pm Standardabweichung; n = 6

Vitalität

In Abbildung 15 ist über 7 Tage der Verlauf der Vitalität von NIH-3T3 Zellen auf der Oberfläche verschieden konzentrierter GelMA-Hydrogele unter dem Fluoreszenzmikroskop zu erkennen. Lebende Zellen wurden mit Calcein AM grün angefärbt und tote Zellen mit EthD-1 rot. An Tag 1 lässt sich in allen drei Konzentrationen eine beginnende Spreizung vitaler Zellen neben einzelnen abgerundeten vitalen Zellen beobachten, an Tag 4 sind bereits Netzwerke auf den Oberflächen zu erkennen. An Tag 7 zeigen sich geschlossene Zellteppiche. Diese befinden sich meist nur auf einer Seite der beiden Geloberflächen eines Hydrogels, wohingegen die andere Seite meist weniger dicht besiedelt ist und gespreizte Zellen in Netzwerken aufweist. Tote Zellen sind in allen Gelen und an allen Versuchstagen selten.

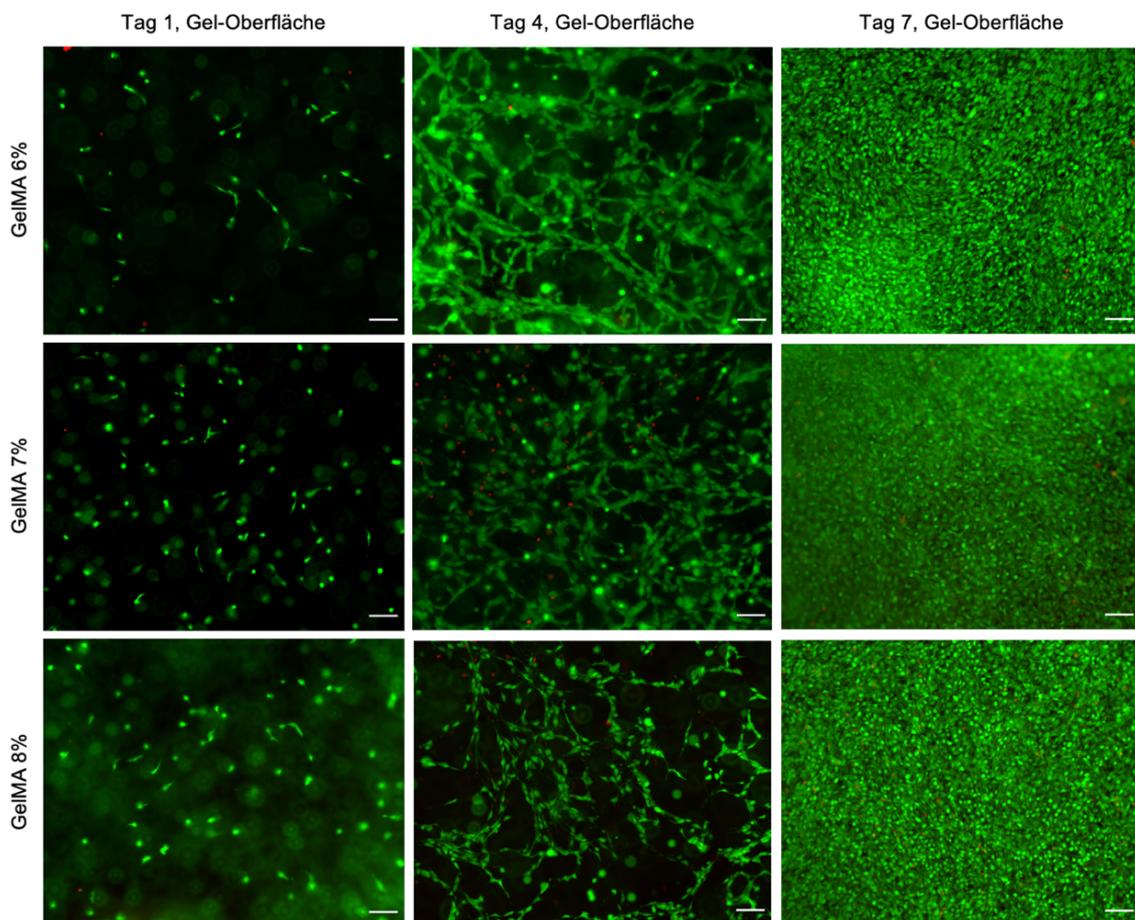


Abbildung 15: Live/Dead-Färbung von NIH-3T3-BCS-Zellen auf 6, 7 und 8 % (m/v) GelMA-Hydrogelen. Repräsentative Aufnahmen von NIH-3T3-BCS-Zellen auf GelMA-Oberflächen an Versuchstagen 1, 4 und 7. Lebende Zellen wurden mit Calcein AM grün, tote Zellen mit EthD-1 rot angefärbt. Maßstabballen entsprechen 100 μm .

Im Vergleich dazu sind in Abbildung 16 die Gelmitten abgebildet, welche das Vitalitätsverhalten von NIH-3T3-Zellen in verschiedenen konzentrierten GelMA-Gelen an Tag 1, 4 und 7 zeigen. An Versuchstag 1 und 4 sowie in allen getesteten Konzentrationen liegen die vitalen Zellen in der Mitte der Gele abgerundet vor. Tote Zellen sind nur vereinzelt und eher an Tag 4 zu beobachten. Eine Zunahme der Zellzahl lässt sich anhand der Aufnahmen für das Gellinnere nicht erkennen. Die detaillierte Analyse der Gelmitten lässt im weiteren zeitlichen Verlauf einen Unterschied im Verhalten der NIH-3T3-Zellen in verschiedenen konzentrierten GelMA-Gelen an Tag 7 erkennen: In 6 % Gelen sind vermehrt sternförmige Zellen (weiße Pfeile) in den Gelmitten sichtbar, wohingegen in den höher konzentrierten Gelen nur sehr selten Spreizungen zu finden sind – diese sind so gering ausgeprägt, dass sie nur bei starker Vergrößerung und guter Auflösung sichtbar werden. Die Anzahl toter Zellen ist an Tag 7 weiterhin niedrig in den Gelmitten.

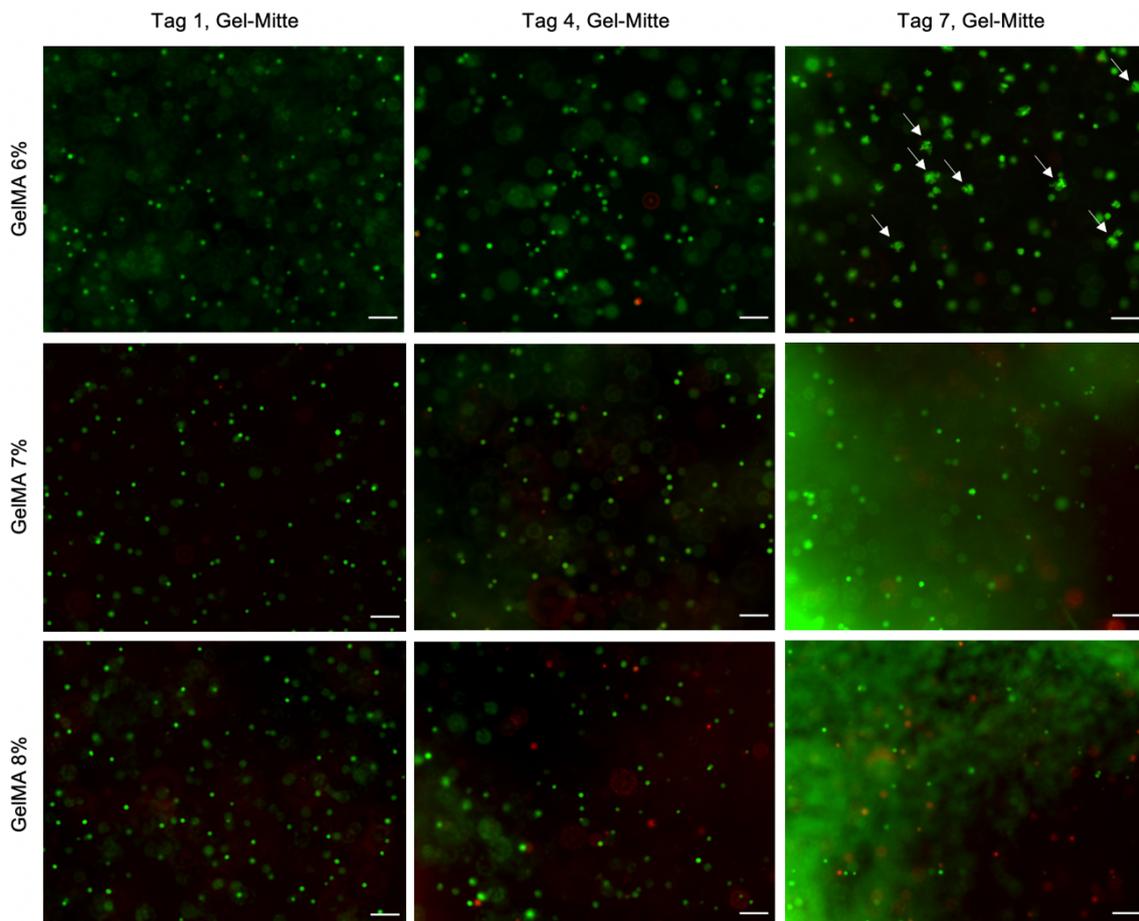


Abbildung 16: Live/Dead-Färbung von NIH-3T3-Zellen in 6 %, 7 % und 8 % (m/v) GelMA-Hydrogelen an Tag 1, 4 und 7. Repräsentative Aufnahmen von NIH-3T3-Zellen in der Mitte von GelMA-Gelen. Lebende Zellen wurden mit Calcein AM grün, tote Zellen mit EthD-1 rot angefärbt. Pfeile deuten auf sternförmig gespreizte Zellen hin. Maßstabballen entsprechen 100 μm .

Abbildung 17 A zeigt eine sternförmig gespreizte Zelle bei 40x Vergrößerung in einem 6 % Gel (weißer Pfeil). Abbildung 17 B zeigt, dass sich in 6 % Gelen bereits an Tag 4 ganz vereinzelt gespreizte Zellen (weiße Pfeile) finden. Dies ist in höher konzentrierten Gelen nicht der Fall.

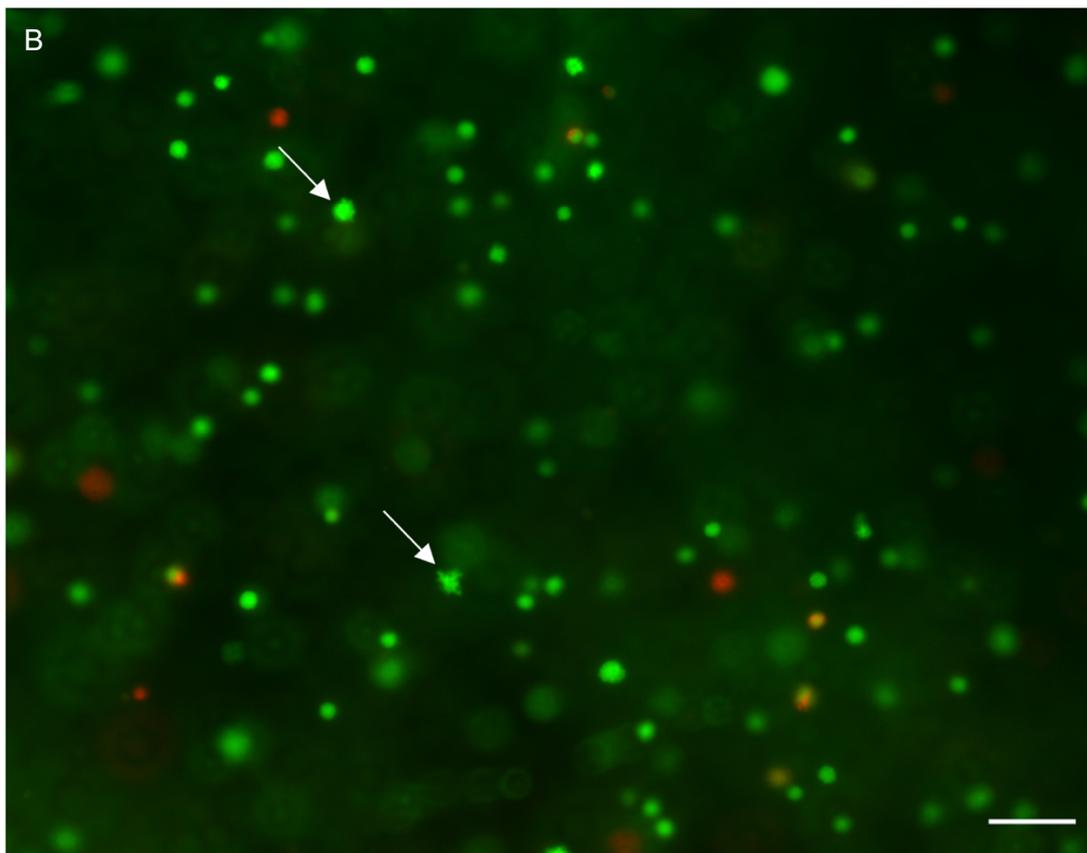
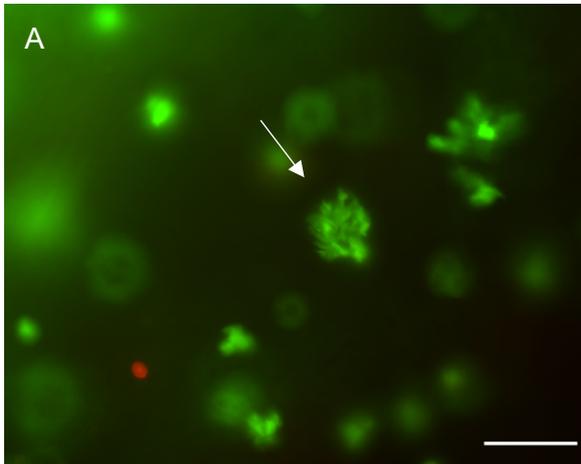


Abbildung 17: Live/Dead-Färbung von NIH-3T3-Zellen in 6 % (m/v) GelMA-Hydrogelen mit sternförmig gespreizten Zellen an Tag 7 (A) und Tag 4 (B). Aufnahmen von NIH-3T3-Zellen in der Mitte eines GelMA-Gels. Lebende Zellen wurden mit Calcein AM grün, tote Zellen mit EthD-1 rot angefärbt. Pfeile deuten auf sternförmig gespreizte Zellen hin. Maßstabballen entsprechen 100 μm .

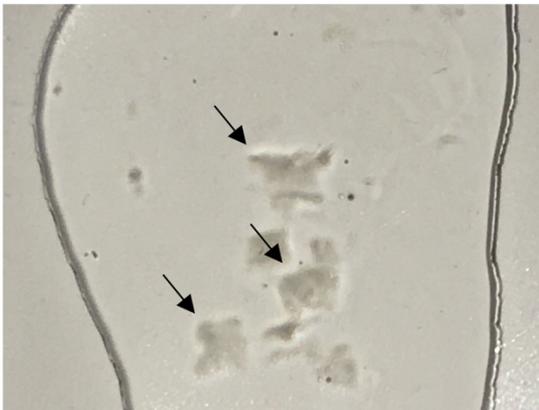
4.5 GelMA: Auswirkung von Proteinzusätzen auf NIH-3T3-Zellen

Um den Einfluss adhäsionsfördernder Proteinzusätze auf NIH-3T3-Zellen in CG-130-GelMA-Gelen zu testen, wurden Hydrogele hergestellt, welche mit Kollagen oder Fibronectin versetzt wurden. Sie enthielten ebenfalls 1×10^6 BCS-adaptierte NIH-3T3-Fibroblasten pro ml Hydrogel.

4.5.1 Kollagen

Es wurden 8 % GelMA-Gele mit 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml und 0,5 mg/ml Kollagen, wie unter 3.2.2.2 beschrieben, hergestellt. Dabei fielen bei der Herstellung der GelMA-Kollagen-Gele Ausflockungen auf. Zur Veranschaulichung der Ausflockungen wurde erneut zellfreies GelMA-Kollagen hergestellt und ausgestrichen, wie in Abbildung 18 zu erkennen (schwarze Pfeile deuten auf Ausflockungen hin). Auf eine Darstellung der Proliferation, des Metabolismus und der Vitalität von NIH-3T3-Zellen in solchen Gelen wird in vorliegender Arbeit aufgrund des unerwünschten heterogenen Gelgemischs verzichtet.

GelMA 8% mit 0,5 mg/ml Kollagen



GelMA 8% mit 0,25 mg/ml Kollagen

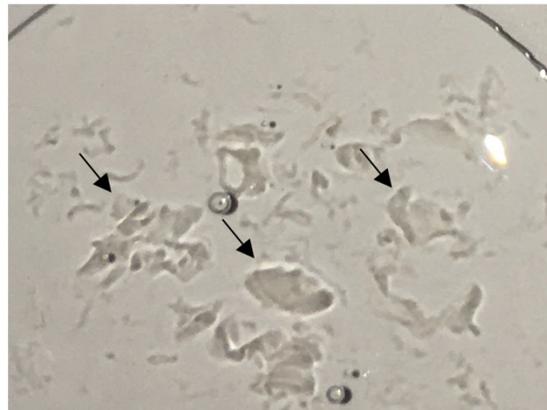


Abbildung 18: Makroskopische Aufnahmen von 8% GelMA-Hydrogele mit Kollagen und Ausflockungen. Ausstrich der zellfreien Hydrogele mit Zusatz von 0,5 mg/ml und 0,25 mg/ml Kollagen. Schwarze Pfeile deuten beispielhaft auf Ausflockung hin.

4.5.2 Fibronektin

Wie unter 3.2.2.2 erläutert, wurden in zwei Versuchsdurchläufen GelMA-Fibronektin-Gele mit einer Konzentration von 8, 7 und 6 % (m/v) GelMA und 25 µg/ml oder 75 µg/ml Fibronektin hergestellt, sowie als Vergleich eine Gruppe fibronektinfreier Hydrogele entsprechender Konzentration. An den Versuchstagen 1, 4 und 7 wurden Proliferation und Metabolismus bestimmt und weiterhin die Vitalität unter dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt.

Metabolismus

Abbildung 19 stellt den Verlauf des Stoffwechsels von NIH-3T3-Zellen in GelMA-Fibronektin Gelen mit 25 µg/ml Fibronektin dar, Abbildung 20 jenen von Zellen in Hydrogelen mit 75 µg/ml Fibronektin. Zwar ist ersichtlich, dass in allen Gelen der Metabolismus an Tag 7 deutlich ansteigt, nachdem er an Tag 4 um die an Tag 1 gemessenen Ausgangswerte schwankt, jedoch scheint Fibronektin keinen eindeutig positiven oder negativen Effekt auf die NIH-3T3-Zellen zu haben. So ist bspw. der Anstieg des Metabolismus von Tag 1 bis Tag 7 in 6 %-Gelen mit 25 µg/ml Fibronektin niedriger als in Gelen ohne Proteinzusatz, in denen der Anstieg nicht nur ca. das Fünf-, sondern fast das Elffache beträgt. In den höher konzentrierten 8 % Gelen ist die Vervielfachung des Stoffwechsels hingegen größer, wenn 25 µg/ml Fibronektin zugesetzt werden. Hingegen führt der Zusatz von mehr Fibronektin (75 µg/ml) in allen drei GelMA-Konzentrationsgruppen zu einer geringeren Zunahme des Metabolismus als in den Hydrogelen ohne Fibronektin. Weiterhin zeichnen sich die Messungen erneut durch hohe Standardabweichungen aus, welche v.a. an Tag 7 zu erkennen sind.

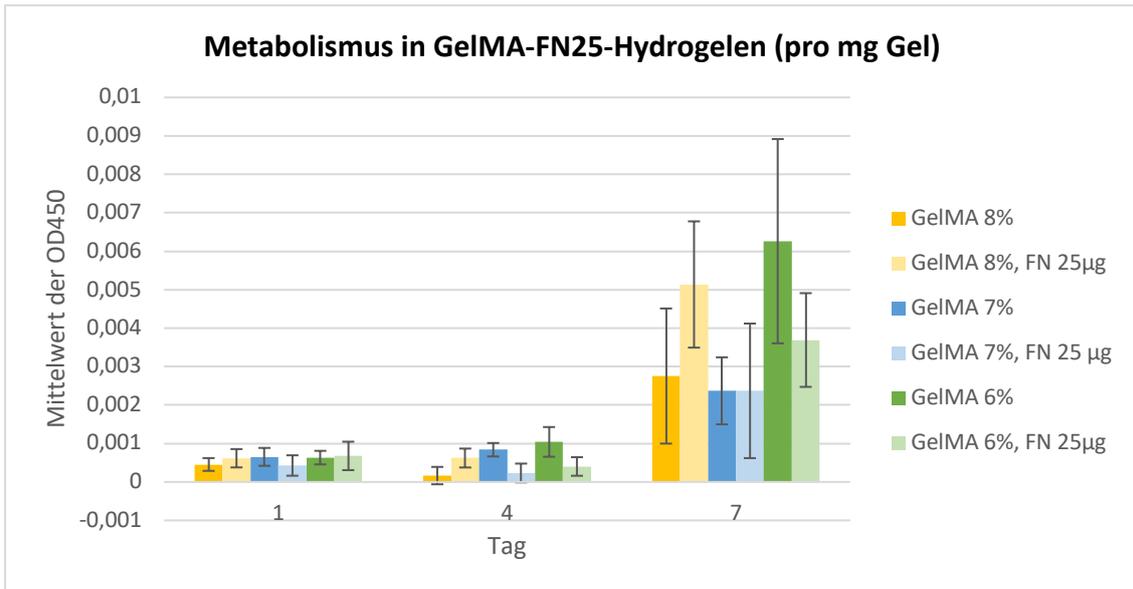


Abbildung 19: Metabolismus pro mg Gel von NIH-3T3-BCS-Zellen in 8, 7 und 6 % GelMA-Hydrogelen mit je 25 µg/ml Fibronektin (FN25). Messung mittels CCK-8-Kit an den Versuchstagen 1, 4 und 7. Mittelwert ± Standardabweichung; n = 6.

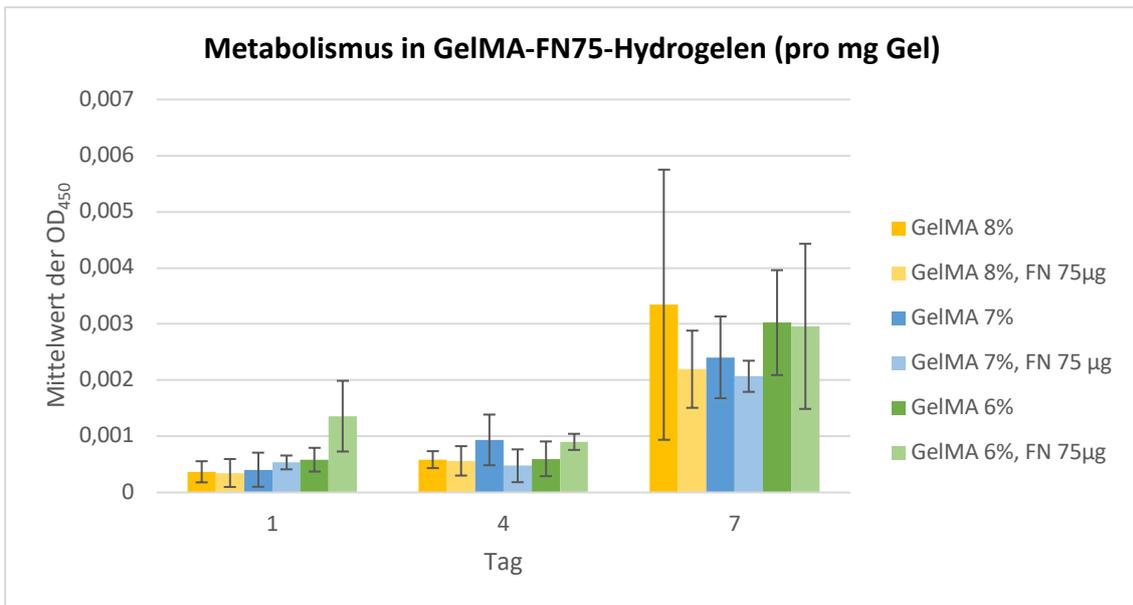


Abbildung 20: Metabolismus pro mg Gel von NIH-3T3-BCS-Zellen in 8, 7 und 6 % GelMA-Hydrogelen mit je 75 µg/ml Fibronektin (FN75). Messung mittels CCK-8-Kit an den Versuchstagen 1, 4 und 7. Mittelwert ± Standardabweichung; n = 6.

DNA-Gehalt

In Abbildung 21 wird der DNA-Gehalt von NIH-3T3-Zellen in GelMA-Gelen mit 25 µg/ml Fibronectin gezeigt, in Abbildung 22 jener der Zellen in Gelen mit 75 µg/ml Fibronectin. Auch hier lässt sich, abgesehen vom deutlichen Anstieg der Proliferation der Zellen in allen Gelen an Tag 7 und der Schwankungen der Messwerte an Tag 4 um die Ausgangswerte, keine Tendenz erkennen, ob Fibronectin die Zellteilung positiv oder negativ beeinflusst. So bewirkt bspw. der Zusatz von 25 µg/ml Fibronectin nur in den 7 % und 8 % Gelen an Tag 7 eine geringe Vervielfachung des ursprünglichen DNA-Gehalts. Hingegen führen 75 µg/ml Fibronectin am letzten Messtag nur in 8 % Gelen zu einem geringen Anstieg gegenüber dem Ausgangsgehalt an DNA. Auch zeigen sich hier wieder v.a. an Tag 7 hohe Standardabweichungen.

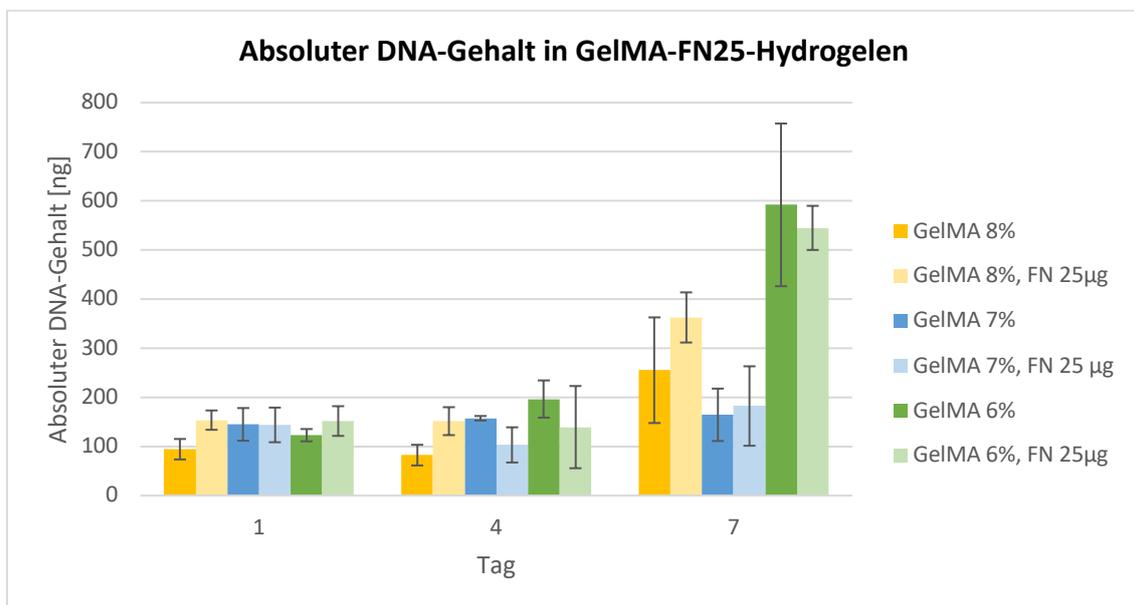


Abbildung 21: Absoluter DNA-Gehalt [ng] von NIH-3T3-BCS-Zellen in 8, 7 und 6 % GelMA-Hydrogelen mit je 25 µg/ml Fibronectin (FN25). Messung mittels PicoGreen (Probenverdünnung 1:8) an den Versuchstagen 1, 4 und 7. Mittelwert ± Standardabweichung; n = 6.

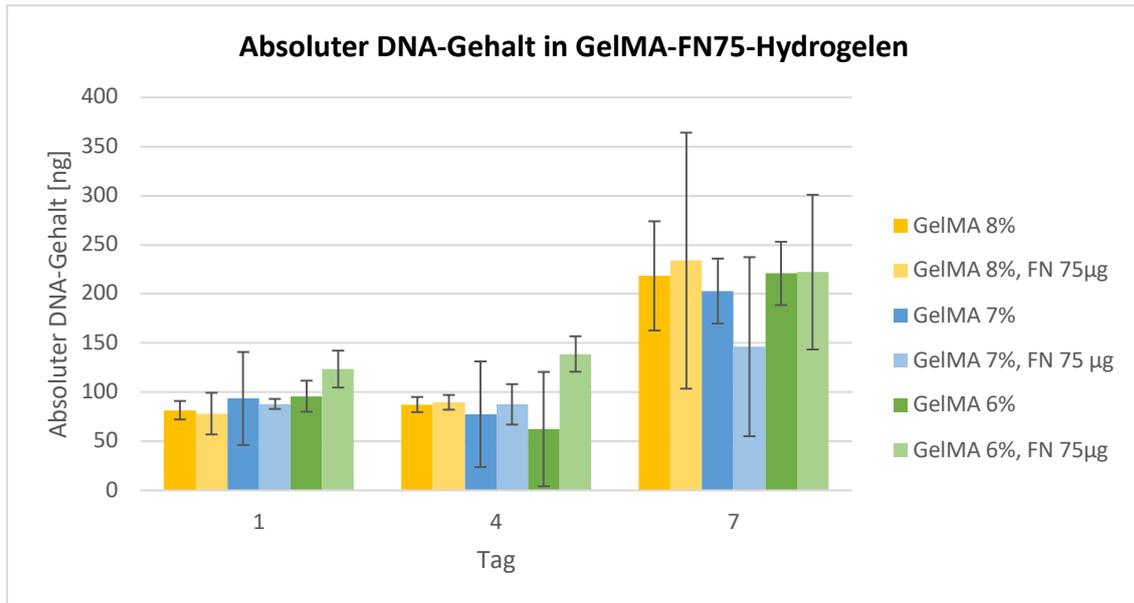


Abbildung 22: Absoluter DNA-Gehalt [ng] von NIH-3T3-BCS-Zellen in 8, 7 und 6 % GelMA-Hydrogelen mit je 75 µg/ml Fibronectin (FN75). Messung mittels PicoGreen (Probenverdünnung 1:8) an den Versuchstagen 1, 4 und 7. Mittelwert \pm Standardabweichung; $n = 6$.

Vitalität

Abbildung 23 stellt die Vitalität und das Verhalten von NIH-3T3-Zellen an Tag 7 dar, welche sich mittig in GelMA-Gelen mit einem Zusatz von 25 µg/ml Fibronectin befinden. In 6 % Gelen lassen sich einige gespreizte Fibroblasten (weiße Pfeile) neben runden vitalen Zellen erkennen, wobei tote Zellen kaum vorhanden sind. In höher konzentrierten Gelen sind Spreizungen in der Gelmitte nicht oder nur sehr selten aufzufinden, tote Zellen sind auch hier selten. Diese Beobachtungen entsprechen jenen, welche bereits mit GelMA-Hydrogelen ohne Proteinzusatz gemacht wurden (siehe Abbildung 16). Eine vermehrte Fibroblasten-Spreizung durch den Zusatz von Fibronectin lässt sich somit unter dem Fluoreszenzmikroskop nicht erkennen.

Tag 7, Gel-Mitte

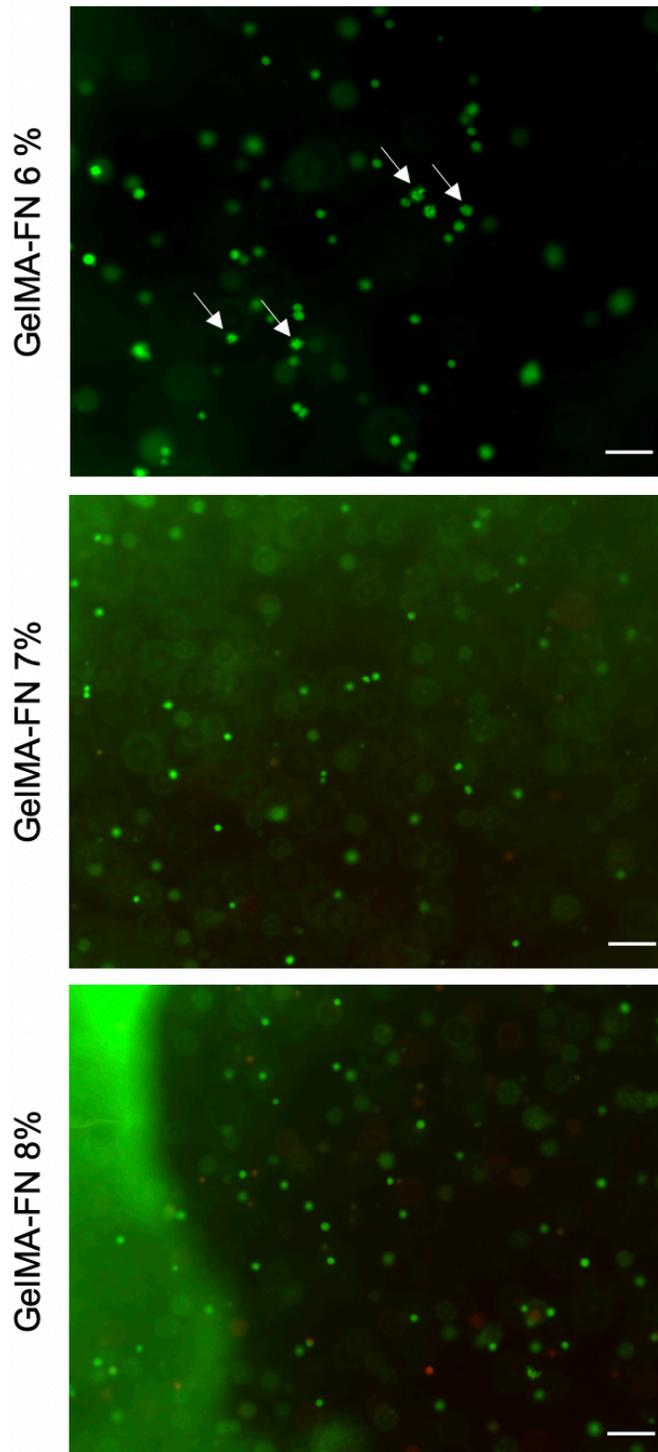


Abbildung 23: Live/Dead-Färbung von NIH-3T3-Zellen in 6 %, 7 % und 8 % (m/v) GeIMA-Hydrogelen mit je 25 µg/ml Fibronectin (FN) an Tag 7. Repräsentative Aufnahmen von NIH-3T3-Zellen in der Mitte von GeIMA-FN-Gelen. Lebende Zellen wurden mit Calcein AM grün, tote Zellen mit EthD-1 rot angefärbt. Pfeile deuten auf sternförmig gespreizte Zellen hin. Maßstabebalken entsprechen 100 µm.

5 Diskussion

Die Verfügbarkeit neuer *vat polymerization*-Techniken geht mit der Notwendigkeit einher, neue Bioharze zu synthetisieren. [8] Da speziell der erst seit kurzem zur Verfügung stehende VB ein vielversprechendes Verfahren ist, um klinisch relevante Konstrukte mit bisher ungeahnter Schnelligkeit drucken zu können, beschäftigt sich vorliegende Arbeit mit einem dafür geeigneten Bioharz der Bezeichnung GelMA. Dieses zu den etablierten Hydrogelsystemen gehörende Bioharz wurde in gegossener Form physikalisch und mechanisch sowie zellbiologisch anhand der Proliferation, des Metabolismus und der Zellvitalität charakterisiert. Unterschiedliche Formen der Modifikation sollten im Anschluss daran der Optimierung der Zytokompatibilität dienen. Der Konzentrationsbereich von 6 – 8 % GelMA erwies sich mit dem VB noch als druckbar und wurde daher für die Versuchsreihe ausgewählt. Niedrigere Polymerkonzentrationen ermöglichten keinen Druck mehr und wurden daher nicht getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass sich GelMA dieser Polymerkonzentrationen als Träger für NIH-3T3-Zellen eignet. Weiterhin führte eine Absenkung des Molekulargewichts zu gesteigerter Zellproliferation und eine Minderung des Polymergehalts, welche mit einer geringeren Hydrogel-Steifigkeit einhergeht, zu vermehrten Zellspreizungen. Der Zusatz von Fibronectin zeigte hingegen keinen Einfluss auf das Zellverhalten.

5.1 Vergleich des Einflusses der Seren FCS und BCS auf NIH-3T3-Zellen

Für die Kultivierung von Zellen werden Medien mit mitogenen Seren tierischen Ursprungs ergänzt, welche Metabolismus, Zellwachstum und Proliferation mithilfe von Wachstumsfaktoren, Proteinen, Vitaminen, Hormonen und Spurenelementen unterstützen. [90] Der Standard unter den supplementierten Seren ist das aus ungeborenen Kuhfeten gewonnene FCS, welches auch am FMZ breit genutzt wird. [90, 91] Vom Hersteller ATCC® der Zellkultur CRL-1658™ der Zelllinie NIH-3T3 wird jedoch empfohlen, speziell diese Zellkultur mit bovinem Kälberserum zu supplementieren, um das Wachstum auf Zellkulturplastik zu unterstützen. [83] BCS wird aus bis zu zwölf Monate alten Kälbern gewonnen, besitzt einen Proteingehalt, der doppelt so hoch ist wie jener von FCS und dient als kostengünstigere Alternative zu diesem. [92] Der Hersteller DSMZ der Zellkultur ACC 59, welche derselben Zelllinie (NIH-3T3) angehört, empfiehlt hingegen den Einsatz von FCS als Supplement zum Zellkulturmedium für die Kultivierung der Zellen auf Zellkulturplastik. [84] Daher wurden BCS-adaptierte mit FCS-adaptierten Zellkulturen

derselben Zelllinie in GelMA verglichen. Die Messungen zeigten, dass an BCS-gewöhnte Zellkulturen einen gesteigerten Metabolismus und höhere Proliferationsraten aufwiesen, dem vermutlich der höhere Proteingehalt von BCS zugrunde lag. Um die Assay-Techniken zu erlernen, wurden zuvor NIH-3T3-beladene AlgGel-Hydrogele hergestellt, welche am FMZ als Standard etabliert sind. Die detektierte Abnahme der Proliferation für BCS-kultivierte Zellen über den Kultivierungszeitraum hinweg (siehe Abbildung 7), stimmt, nach mündlicher Kommunikation, mit den von der Promovendin Maxi Klauwert beobachteten Ergebnisse überein, wohingegen der von ihr beobachtete leicht ansteigende Metabolismus von Tag 4 bis Tag 7 nicht bestätigt werden konnte (siehe Abbildung 6). Aufgrund der im zeitlichen Verlauf abnehmenden Werte von Metabolismus und Proliferation für NIH-3T3-Zellen in AlgGel-Gelen, wurde nach einem alternativen Hydrogel gesucht und in vorliegender Arbeit die Zytokompatibilität von GelMA auf NIH-3T3-Zellen evaluiert.

5.2 Einfluss von GelMA-Modifikationen auf die Zytokompatibilität

Malada *et al.* haben 2013 die Theorie des „*biofabrication window*“ vorgestellt: Eine hohe Formtreue wird klassischerweise durch steife Hydrogele erreicht, die entweder viel Polymer oder einen hohen Vernetzungsgrad aufweisen. Hingegen erzielen weiche Hydrogele eine hohe Zytokompatibilität. Die traditionelle Biofabrikation verfolgt daher einen Mittelweg, was jedoch zu einer Kompromittierung auf beiden Seiten führt. Deshalb soll dieses Fabrikationsfenster mithilfe neuer Strategien verschoben werden - hin zu niedrigen Polymerkonzentrationen, einer besseren Zytokompatibilität und trotzdem hoher Formtreue. [30]

Es besteht ein Defizit an Biotinten, welche diese Anforderungen erfüllen.

Verschiedene GelMA-Konzentrationen

Daher wurde in vorliegender Arbeit mit einer Versuchsreihe der Einfluss niedrigerer GelMA-Konzentrationen auf die Zellen getestet. Neben 8 % GelMA-Gelen wurden 7 % und 6 % Gele ausgewählt, da sich diese noch volumetrisch drucken lassen. Für die gewählten Konzentrationen wurde an den Tagen 1, 4 und 7 die metabolische Aktivität und der DNA-Gehalt quantitativ via Foto- oder Fluorometrie und die Vitalität qualitativ via Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Die an Tag 4 (siehe Abbildung 16) beobachteten abgerundeten Zellen in den Gelmitten befanden sich vermutlich im Stadium der Quieszenz, einem reversiblen Proliferationsstopp, welcher durch fehlende Adhäsion, Kontaktinhibition oder Nahrungsdefizit verursacht wird. [93] Im Gegensatz zu den meisten anderen

Zelltypen bedeutet dies jedoch einen Erhalt der Stoffwechselaktivität. [93, 94] Für die abgestorbenen Zellen, welche vereinzelt zu erkennen waren, waren vermutlich Nahrungselimination, Einbettungsstress während der Hydrogelherstellung, sowie Schwellung oder Austrocknung der Gele verantwortlich. [43, 61] Da trotz dieser mikroskopisch detektierten toten Zellen, welche ebenfalls in die Messung des DNA-Gehalts eingehen, die metabolische Aktivität der quieszenten Fibroblasten an Tag 4 pro Gelgewicht gleich blieb (siehe Abbildung 13), ist anzunehmen, dass die wenigen abgestorbenen Zellen keinen schädlichen Einfluss auf die lebenden Zellen verursachten und dass diese die gemessene Stoffwechselaktivität nicht erkennbar beeinflussten. Weiterhin schien die erhöhte Netzwerkdicke auf den Geloberflächen an Tag 4 bei gleichbleibendem Metabolismus und Proliferation auf eine beginnende Migration von Fibroblasten aus der Mitte an die Geloberfläche hinzuweisen. Die Zellteppiche auf den Geloberflächen an Tag 7 (siehe Abbildung 15) stimmten mit einer Beobachtung von Pepelanova *et al.* 2018 überein, wonach humane mesenchymale Stammzellen, eingebettet in hoch funktionalisierte 5 % (m/v) GelMA-Hydrogele, nach einer Woche auf der Oberfläche ein starkes Zellwachstum aufweisen. [42] Diese unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennbare starke Proliferation auf den Geloberflächen erklärt auch die höheren Messwerte für Metabolismus und Proliferation an Tag 7 (siehe Abbildung 13 und Abbildung 14), welche sich in allen drei Versuchsdurchläufen zeigten. Dabei konnte die Beobachtung ähnlicher Ergebnisse von mehreren, unabhängigen Wiederholungen je einer experimentellen Bedingung die methodisch korrekte Ausführung der Gelherstellung, Kultivierung und Messung bestätigen. Begründen lässt sich die starke Proliferation auf den Geloberflächen anhand der Mechanosensitivität von Zellen: In einer 2D-Kultur oder auf einer Oberfläche spreizen Zellen auf steifem Untergrund, wie auch Solon *et al.* 2007 anhand von Fibroblasten auf Polyacrylamidgelen zeigen. [95] Sobald der Untergrund den zellimmanenten E-Modul, etwa 5 kPa, übersteigt, bildet die Zelle mit ihren Aktinfilamenten Stressfasern aus und beginnt sich zu spreizen. [95] Eine gespreizte adhärente Zelle hat wiederum die Möglichkeit sich zu teilen. Hingegen verhalten sich Zellen in dreidimensionaler Umgebung genau konträr: Sie spreizen nur innerhalb einer weichen 3D-Umgebung, behalten aber im steifen Umfeld ihre runde Form bei. [65] In GelMA-Gelen wird eine gesteigerte Hydrogelsteifigkeit durch hohe GelMA-Konzentrationen oder Funktionalisierungsgrade hervorgerufen und geht mit kleinen Porendurchmessern einher. [42, 96] Kleine Porenvolumina führen wiederum zu räumlichen Einschränkungen, die Zellfunktionen wie Adhäsion, Spreizung, Migration und Proliferation verhindern. [66] Die Zellen behalten innerhalb steifer GelMA-Gele somit ihre runde Form bei. Die großen

Standardabweichungen, welche sich bei den Messungen des Metabolismus und der Proliferation an Tag 7 zeigten, könnten in einer ungleichmäßigen Zellaussaat an Tag 1 begründet liegen, welche sich erst mit dem exponentiellen Wachstum der Zellen bemerkbar machen würde. Eine weitere Vermutung liegt in der Zugänglichkeit der Zellen zum Nährmedium: Manche Hydrogele wiesen herstellungsbedingt Lufteinschlüsse auf, wodurch sie im Gel schwammen und nicht dem Wellboden auflagen. Dadurch bestand ein beidseitiges Nahrungsangebot, was einen positiven Effekt auf die Zellteilung auf beiden Hydrogelseiten und somit auf DNA-Gehalt und Stoffwechsel gehabt haben könnte. Im Gegensatz zeigten andere Gele unter dem Fluoreszenzmikroskop nur einen einseitigen Zellteppich, was vermutlich darin begründet lag, dass die Hydrogele ohne Lufteinschlüsse konstant mit einer Seite dem Wellboden auflagen. Die Zellen in solchen Gelen erhielten auf diese Weise ein reduziertes Nahrungsangebot.

Nichol *et al.* beobachteten 2010, dass Hydrogele mit unterschiedlichen GelMA-Anteilen einen unterschiedlichen Einfluss auf eingebettete NIH-3T3-Zellen haben. [43] Sie zeigen einerseits, dass mit steigender GelMA-Konzentration die initiale Vitalität der Zellen abnimmt und andererseits, dass nach einer Kultivierung von 3 Tagen Zellen in 5 % (m/v) GelMA-Gelen elongieren, migrieren, Netzwerke bilden und das Hydrogel degradieren. Dies sei in 10 % und 15 % Gelen nur in deutlich geringerem Ausmaß zu beobachten. Jedoch geht aus dem Artikel nicht eindeutig hervor, ob die Zellmorphologie auf den Geloberflächen oder in den Gelmitten beobachtet wird. [43] Die detaillierte Analyse der Gelmitten in dieser Arbeit konnte Nichols Beobachtungen bestätigen, da auch hier ab Tag 4 in den niedrig konzentrierten 6 % Gelen eine wachsende Anzahl gespreizter Fibroblasten zu erkennen war, welche sich in höher konzentrierten Gelen gar nicht oder, wenn überhaupt, erst später und in deutlich reduzierter Form zeigten (siehe Abbildung 16 und Abbildung 17). Ein möglicher Grund für den zellmorphologischen Unterschied zwischen den GelMA-Konzentrationen in vorliegender Arbeit und bei Nichol könnte die geringere Netzwerkdicke niedrig konzentrierter Gele sein, welche verschiedene Ursachen haben kann: Einerseits ist die Porengröße invers proportional zur GelMA-Konzentration, wie Lee *et al.* 2015 zeigen. [96] Nach ihren Messungen im Rasterelektronenmikroskop weisen 5 % GelMA-Gele Poren mit einem Durchmesser von 34 μm und 25 % Hydrogele nur einen Durchmesser von 4 μm auf. Jedoch muss beachtet werden, dass Lee *et al.* keine gequollenen, sondern lyophilisierte Gele analysieren. Polymernetzwerke mit Porenvolumina, die geringer als die Größe der darin eingebetteten Zellen sind, schränken Zellfunktionen wie Adhäsion oder Proliferation ein. [66] Dies würde die Spreizung der

Fibroblasten in großporigen 6 % GelMA-Gelen im Vergleich zu den höher konzentrierten Gelen erklären. Andererseits könnte aber auch die bessere Degradierbarkeit niedrig konzentrierter Hydrogele eine Rolle spielen. So zeigen 2016 Zhao *et al.*, dass 5 % GelMA-Gele in weniger als 3 Tagen vollständig in einer Kollagenaselösung abgebaut werden, wohingegen dieser Prozess bei 10 % Gelen etwa viermal so lange dauert. [97] Die mit Enzymen versetzte Lösung wird hier herangezogen, um die Degradierung versuchstechnisch zu beschleunigen. [97] Vor diesem Hintergrund ist es denkbar, dass die Porengröße von Hydrogelen niedriger Konzentration durch enzymatische Degradation schneller zunimmt und Zellen so ihre Funktionen ausüben können. Zuletzt sollte bedacht werden, dass der oberflächliche Zellteppich generell das Erkennen gespreizter Fibroblasten im Gelinneren erschwert haben könnte. Daher wäre es sinnvoll, in zukünftigen Versuchen die einzelnen Hydrogelschichten mithilfe einer überlagerungsfreien Darstellung, beispielsweise dem Konfokalmikroskop, genauer zu untersuchen. Durch vorherige Phalloidin-Färbung der Aktinfilamente kann so die Zellform in jeder einzelnen Schicht sicher erkannt werden, da das Konfokalmikroskop nicht das gesamte Objekt zugleich durchleuchtet, sondern nur die jeweils fokussierte Schicht.

Auf Grundlage des beobachteten Unterschieds im Spreizungsverhalten wurden physikalische und mechanische Messungen an Gelen mit 6 %, 7 % und 8 % GelMA durchgeführt. Schuurman *et al.* 2013 und Ibañez *et al.* 2021 zeigen in Studien mit dem Hydrogelsystem GelMA bereits, dass der Kompressionsmodul und somit die Steifigkeit der Hydrogele mit höherer Polymerkonzentration steigt. [39, 98] Die Ergebnisse stimmen mit den Daten dieser Arbeit überein: Auch hier wurden mit steigender Konzentration höhere E-Module gemessen, welche höherer Gel-Steifigkeit entsprechen (siehe Abbildung 12). Ein photovernetztes Hydrogel enthält nach der Polymerisation wegen ungleichmäßiger Lichtaussaat meist noch unregelmäßig vernetzte Anteile, unverbrauchte Vernetzer und freie Monomerketten. Die übriggebliebenen Vernetzer, bei GelMA die unverbrauchten Radikale, führen im Anschluss an die eigentliche Polymerisation zu weiterem *Crosslinking*, was zu einer Verdichtung des Netzwerks führt. [99] Dies wiederum resultiert im Auspressen gelständiger Flüssigkeit. Die in dieser Arbeit dokumentierte steigende Feuchtgewichtsabnahme war proportional zur steigenden Gelkonzentration (siehe Abbildung 11). Demnach lässt sich daraus schließen, dass in 8% Gelen mehr Vernetzung im Anschluss an das eigentliche *Crosslinking* stattfand, da hier mehr unverbrauchte Radikale vorlagen. Eine stärkere Vernetzung wiederum geht mit einer höheren Steifigkeit

einher. [65, 100] Daher belegen auch diese Daten die höhere Steifigkeit höher konzentrierter GelMA-Gele.

Wenngleich in vorliegender Arbeit physikalisch und mechanisch sowie qualitativ unter dem Fluoreszenzmikroskop Unterschiede zwischen den GelMA-Konzentrationen zu erkennen waren, ließen sich diese in Bezug auf Zellteilung und Stoffwechsel in drei aufeinanderfolgenden Versuchsdurchläufen nicht finden, da sich die Trends jedes Mal etwas unterschieden. Dies könnte darin begründet liegen, dass die gewählten Konzentrationen so eng beieinander lagen, dass sich die Effekte auf die Zellen zu sehr ähnelten und so die Messwerte alle mehr oder weniger um einen Mittelwert schwankten. Zusammenfassend lassen die Daten der vorliegenden Arbeit darauf schließen, dass GelMA-Hydrogele mit den hier gewählten Konzentrationen ein so dichtes Netzwerk im Gelinneren aufwiesen, dass ein Großteil der Fibroblasten in das Stadium der Quieszenz übergang. Die Steifigkeit der Gele führte hingegen ebenfalls dazu, dass die Spreizung und damit die Proliferation oberflächlich angesiedelter Zellen unterstützt wurde. Die These lässt sich anhand der gemessenen E-Module bestätigen, wonach alle Gele eine Steifigkeit von mindestens 5 kPa aufwiesen und daher eine oberflächliche Spreizung der Fibroblasten nach Solon *et al.* zu erwarten war, da der zellimmanente E-Modul überschritten wurde. [95] Da die 6 % Gele, wie im mechanischen Vergleich gezeigt, trotzdem etwas weicher waren, kam es dort vermutlich zu einer beginnenden Spreizung im Gelinneren, die an Tag 7 gut erkennbar war und welche sich in den höher konzentrierten Gelen kaum oder gar nicht zeigte. Da die Spreizung jedoch noch nicht sehr ausgeprägt war, kam es vermutlich auch noch nicht zu stark vermehrten Zellteilungen. Da weiterhin der Metabolismus bei quieszenten und aktiven Fibroblasten im gleichen Maße vorhanden ist, konnten diese geringen Unterschiede im Proliferations- und Stoffwechsel-Assay vermutlich nicht dargestellt werden.

Verschiedene GelMA-Molekulargewichte

Wenngleich keine Differenzen in der Zellteilung zwischen den drei Gel-Konzentrationen zu erkennen waren, ließ sich ein Unterschied in der Proliferation zwischen zwei GelMA-Batches verschiedenen Molekulargewichts erkennen. Der *Batch* CG-130 zeichnete sich durch einen schnelleren Herstellungsprozess aus, da er nur eine Dialyse und Lyophilisierung durchlaufen hatte, im Vergleich zum *Batch* CG-M, welcher zweifach prozessiert worden war. Aufgrund der einfachen Prozessierung des *Batches* CG-130 lag das Molekulargewicht dessen bei 392 kDa und war damit fast viermal so groß wie das des

Batches CG-M (92 kDa). Die Funktionalisierung beider *Batches* war annähernd gleich und betrug im Durchschnitt $89,2 \pm 2,1$ %. Diese Daten wurden bereitgestellt durch den Doktoranden Csaba Gergely, Doktorand am FMZ in Würzburg. Ein höheres Molekulargewicht, hervorgerufen durch mehr Vernetzungen im Gel, führt zu einer erhöhten Steifigkeit und eine höhere Steifigkeit geht mit kleineren Poren einher. [42, 100] Weiterhin können Zellen sich innerhalb weicher Gele besser an die 3D-Umgebung adaptieren. [65] Daher kam es in GelMA-Gelen des *Batches* CG-M vermutlich zu erhöhten Proliferationsraten (siehe Abbildung 10). Da jedoch eine steife Oberfläche, wie sie Gele des *Batches* CG-130 anboten, die Proliferation von darauf angesiedelten Zellen ebenfalls unterstützt, ist davon auszugehen, dass noch ein weiterer Faktor die bessere Zytokompatibilität des weichen GelMAs mit dem niedrigeren Molekulargewicht bestimmte: Es besteht die Vermutung, dass dieser weiche *Batch* neben den Geloberflächen zusätzlich innerhalb der Gele eine großporige Umgebung bot, sodass eine Zellproliferation dort ermöglicht werden konnte. Somit besteht die Annahme, dass der *Batch* CG-M den Zellen im Vergleich räumlich mehr Platz zur Teilung bot: Sowohl auf den steiferen Geloberflächen als auch in den weicheren Gelmitten.

Proteine als Additive zu GelMA

Fibroblasten sind adhärente Zellen, das heißt sie sind primär auf eine Verankerungsmöglichkeit angewiesen, um im Anschluss elongieren, migrieren oder proliferieren zu können. [101] Im Hydrogelsystem GelMA werden durch die Gelatine adhäsive RGD-Sequenzen bereitgestellt. [19] Da in dieser Arbeit zelluläre Spreizung, Netzwerkbildung und Proliferation im Vitalitäts-Assay hauptsächlich auf der Geloberfläche zu erkennen waren, wurde nach einer Lösung gesucht, die Zelladhäsion auch im Gelinneren zu unterstützen, damit dort ebenfalls Teilungen stattfinden. Als Ansatz sollte dafür die Einbettung adhäsionsvermittelnder Proteine in GelMA dienen, zu welchen unter anderem Fibronectin, Kollagen, Laminin und Osteopontin zählen. [24] Diese enthalten ebenfalls RGD-Sequenzen, an welche zellständige Integrine binden können. [22] In dieser Arbeit wurde der Effekt von Fibronectin und Kollagen auf NIH-3T3-beladene GelMA-Hydrogele der bereits untersuchten Konzentrationen getestet. Als Orientierung für Fibronectin-versetztes GelMA diente ein Artikel von Koti *et al.* 2019, in welchem GelMA-Gele mit Kardiomyozyten oder Kardioblasten beladen und anschließend mittels Extrusionsdruck gedruckt und vernetzt werden. [61] Da es in kardiomyozyten-beladenen Gelen nach 7 Tagen kaum zu Zellproliferationen kommt, werden diese mit 10 µg/ml Fibronectin versetzt, was zu einer signifikanten Verbesserung der Spreizung führt. [61] In einem weiteren Artikel

von Berger *et al.* 2020 bewirkt die Zugabe von 25 µg/ml Fibronectin zu GelMA/Kollagen-Gelen eine Verdopplung der Invasion von Einzelzellen aus Tumorzell-Sphäroiden ins Hydrogel. [102] Trotz der im Vergleich zu Koti *et al.* und Berger *et al.* gleichen oder sogar höheren Fibronectin-Konzentrationen von 25 µg/ml und 75 µg/ml konnte der von den Autoren beschriebene positive Effekt auf das Zellverhalten von Kardiomyozyten bzw. Tumorzellen für die in dieser Arbeit verwendeten Fibroblasten nicht bestätigt werden. Hier könnten zelltypspezifische Unterschiede bei der Wirksamkeit des Additivs eine Rolle spielen.

Ein weiterer Grund für das Vorliegen vorwiegend runder Fibroblasten in der Gelmitte steiferer GelMA-Gele (siehe Abbildung 23) könnte sein, dass, obwohl Ankersequenzen die Adhäsion unterstützen, räumliche Einschränkungen dazu führen, dass Zellen nicht spreizen können. [66] Um diese Problematik zu umgehen, wäre es sinnvoll, den Porendurchmesser in den Hydrogelen zu vergrößern, beispielsweise durch den Einsatz photodegradierbaren GelMAs. Tsang *et al.* haben 2015 ein solches Hydrogel kreiert, indem sie die Methacrylatgruppen des GelMAs mit photodegradierbaren PEG-Vernetzern *crosslinken*, sodass die Degradation des Hydrogels beschleunigt werden kann. [103] Die Aussaat von Kardiomyozyten auf derartiges GelMA, welches davor vernetzt und teilweise degradiert wird, zeigt dort eine Adhäsion und Spreizung dieser und damit eine Zytokompatibilität. [103]

Ebenfalls denkbar ist, dass das Fibronectin während der Inkubation im Zellkulturmedium aus den Gelen herausgelöst wurde. Proteine werden nur dann im Polymernetzwerk festgehalten, wenn der hydrodynamische Radius kleiner ist als der Porendurchmesser. [22] So zeigen Trujillo *et al.* 2020 mittels Immunfärbung, dass selbst nach 24 h kein Verlust von kovalent an PEG und damit in das Hydrogel gebundenem Fibronectin besteht. [104] Wird das Protein hingegen ohne kovalente Anbindung dem Gel beigemischt, sind nach ebenso langer Zeit nur noch etwa 90 % der initialen Menge vorhanden. Trujillo *et al.* arbeiten hier mit einer Immunfärbung von Fibronectin im Kryoschnitt durch einen primären und sekundären Antikörper. [104] Diese Methode ließe sich auch in zukünftigen Versuchen heranziehen, um zu kontrollieren, wie groß der Anteil des verbliebenen Fibronectins im zeitlichen Verlauf tatsächlich ist. Sofern sich ein Verlust des Proteins bestätigen ließe, könnten Proteine oder Peptide wie beispielsweise RGD mit reaktiven Gruppen ausgestattet werden, damit diese aktiv an der Netzwerkbildung beteiligt sind und so in diesem verankert bleiben.

Als weiteres adhäsionsvermittelndes Protein wurde Rattenschwanzkollagen dem unvernetzten GelMA beigemischt. Stratesteffen *et al.* berichten 2017 von einem äußerst positiven Effekt des Kollagens auf in GelMA befindliche humane mesenchymale Stammzellen (hMSC). [25] Demnach liegen hMSCs in GelMA-Gelen der Konzentrationen 2,8 % und 4 % (m/v) gespreizt und spindelförmig vor, sofern diese mit Kollagen (0,208 % oder 0,16 % (m/v)) versetzt sind. [25] Auch Berger *et al.* berichten 2017 von einem positiven Effekt bovinen Kollagens auf das Spreizungsverhalten von Brustkrebszellen, welche in GelMA-Gele eingebettet werden. [105] Sie vergleichen GelMA-Gele verschiedener Steifigkeiten (2, 7 und 12 kPa), die je drei verschiedene Kollagenkonzentrationen (0 mg/ml, 1,5 mg/ml und 3 mg/ml) aufweisen. Dabei beobachten sie, dass die Krebszellen in Anwesenheit von Kollagen spreizen, jedoch ihre runde Form beibehalten, wenn kein Kollagen zugesetzt wird. Weiterhin fällt dabei auf, dass trotz Kollagenzusatz eine höhere Steifigkeit der Gele immer zu einem verminderten Spreizungsvermögen der Zellen führt. [105] In Anlehnung an diesen Artikel wurden GelMA-Kollagen-Gele mit Endkonzentrationen von 0,125 mg/ml bis 0,5 mg/ml Kollagen hergestellt. Diese konnten für Messungen jedoch nicht weiter berücksichtigt werden, da die Hydrogele Ausflockungen aufwiesen (siehe Abbildung 18). Dies lag vermutlich in der Kollagen-Herkunft begründet, da im Gegensatz zu bovinem Kollagen Rattenschwanzkollagen verwendet wurde. Dieses geliert bei Raumtemperatur schneller. [106] Daher empfiehlt sich ein erneuter Versuchsdurchlauf, in welchem Rattenschwanzkollagen dem GelMA-Präpolymer unter Lagerung aller verwendeten Lösungen auf Eis beigemischt wird. [106, 107] Weiterhin ist interessant, dass Stratesteffen *et al.* außerdem darauf hinweisen, dass hMSCs in 5 % (m/v) GelMA-Gelen mit 0,16 % (m/v) Kollagen weiterhin abgerundet vorliegen, also nicht adhären und proliferieren können. Diesen Effekt führen sie auf die 1 % höhere GelMA-Konzentration zurück und stellen die Vermutung an, dass dieser Konzentrationsunterschied für hMSCs wohl entscheidend sei, um versorgt zu werden und migrieren zu können. [25] Daraus ließe sich ein zellspezifisches Verhalten schlussfolgern. Denn wie bereits erwähnt, berichten Nichol *et al.* von sich spreizenden NIH-3T3-Zellen in 5 % (m/v) GelMA-Gelen. [43] Auch Berger *et al.* berichten neben den Krebszellen von einem anderen Zelltyp (Epithelzellen), der in GelMA/Kollagen-Gele eingebettet wird. [105] Dieser weist im Gegensatz zu den Krebszellen auch ohne Kollagenzusatz ein Spreizungsvermögen auf, welches jedoch mit zunehmender Gelsteifigkeit abnimmt. Trotz allem verbessert Kollagen hier oft zu einem geringen Grad die Spreizung der Epithelzellen – auch bei zunehmender Steifigkeit. [105] Diese beiden Punkte unterstützen die These, dass die Steifigkeit eines Gels das Zellverhalten primär beeinflusst, wobei unterschiedliche

Zelltypen hier von Grund aus verschieden auf gleiche Gegebenheiten reagieren. Demnach scheinen Fibroblasten in steifen Gelen bspw. trotzdem etwas besser zu spreizen als im Vergleich mesenchymale Stammzellen. Somit ist die primäre Anforderung der Fibroblasten an eine 3D-Umgebung eine niedrige Netzwerkdicke, um gut adhären zu können. Eine Verbesserung der Adhäsion mithilfe von Proteinen wäre empfehlenswert, jedoch erst im Anschluss. Eine Herabsetzung der Netzwerkdicke kann drucktechnisch bedingt nicht durch eine weitere Senkung der Polymerkonzentration erfolgen. Daher müssen andere Lösungen herangezogen werden. Eine Möglichkeit wäre die Vergrößerung der Hydrogel-Poren, beispielsweise durch zugesetzte Nanosilikate. Xavier *et al.* berichten 2015, dass die Synthese von Nanosilikat-GelMA bei gleichbleibender Zytokompatibilität von Präosteoblasten in größeren Poren und gesteigertem Kompressionsmodul resultiert und zusätzlich die Druckbarkeit verbessert. [18, 108]. Weiterhin sollen Nanosilikate die Zelladhäsion unterstützen, da sie über ihre Oberfläche mit Integrinen einen Verbund eingehen können. [109]

5.3 Fazit und Ausblick

Es lässt sich schlussfolgern, dass die Verwendung der NIH-3T3-Zellkulturen, welche an das proteinreichere BCS gewöhnt sind, sinnvoll erscheint, da diese mehr proliferierten und metabolisch aktiv waren. Insofern ist es naheliegend, auch zukünftig bovines dem fötalen Kälberserum bei der Kultivierung von entsprechenden NIH-3T3-Zellkulturen in Hydrogelen vorzuziehen. In Bezug auf eine Verbesserung der Zytokompatibilität von GelMA-Hydrogelen liefern die erhobenen Daten der vorliegenden Arbeit erste Ansätze zu möglichen Modifikationen des Hydrogels. Es konnte gezeigt werden, dass die Proliferation in GelMA-Gelen eines niedrigeren Molekulargewichts verbessert war, was vermutlich mit der geringeren Steifigkeit zusammenhängt. Daher erscheint es sinnvoll abzuwägen, zukünftig Gele eines niedrigeren Molekulargewichts herzustellen, wenngleich dies eine aufwendigere Produktion des GelMAs impliziert. Da 6 % GelMA-Gele, die den niedrigsten E-Modul aufwiesen, im Gellinneren eine früh beginnende und zunehmende Spreizung zeigten, liegt die Vermutung nah, dass der Polymergehalt auf die Zellen einen bedeutenden Einfluss hatte. Anhand dieser Beobachtungen erscheint folgende Aussage plausibel: Eine niedrige Polymerkonzentration führt zu größeren Poren und einer besseren Degradierbarkeit der Gele. [96, 97] Diese Faktoren führen wiederum zu einer gesteigerten Zytokompatibilität der Hydrogele, indem auf diese Weise bspw. zelleigene EZM abgelagert werden kann, Platz für Proliferation geschaffen wird oder interzelluläre Interaktionen ermöglicht werden. [42, 66] Um die beobachteten Unterschiede in der

Zellmorphologie auf ihre Richtigkeit hin zu überprüfen, wäre zukünftig eine Darstellung der einzelnen Hydrogelschichten mit dem Konfokalmikroskop sinnvoll. Wenngleich die 6 % GelMA-Gele im Inneren Zellspreizungen zeigten, lässt sich die verbesserte Zytokompatibilität dieser anhand des quantitativen Proliferations- und Metabolismus-Assays des Gesamtgels nicht bestätigen. Die unter dem Mikroskop qualitativ sichtbare, beginnende Adhäsion in der Gelmitte ging vermutlich noch nicht mit einer erkennbaren Steigerung der Proliferation einher, sodass sich Zellzahl und Stoffwechsel im Vergleich mit den höher konzentrierten Gelen nicht unterschieden. Womöglich würden sich Unterschiede zwischen den verschiedenen konzentrierten Hydrogelen eher zeigen, wenn diese größere Differenzen in der Polymerkonzentration aufwiesen. Dies ließe sich in zukünftigen Versuchen nachvollziehen. Als limitierender Faktor ist hier jedoch die Druckbarkeit zu beachten, welche mit sinkender Polymerkonzentration abnimmt. Konzentrationen von 6 % markierten die untere Grenze des mit dem VB noch druckbaren GelMAs. Positive Effekte Fibronektins und Kollagens auf die Zelladhäsion ließen sich nicht bestätigen. Daher sollte zukünftig eine Anpassung der Methoden bedacht werden, wie beispielsweise die kovalente Einbindung der Proteine in das Polymergerüst, sofern eine Auswaschung dieser beobachtet würde. Die Netzwerkdicke der verwendeten Gele war für die eingebetteten NIH-3T3-Zellen vermutlich zu hoch, da eine Spreizung mit Ausnahme der 6 % Gele beinahe komplett ausblieb. Da räumliche Limitationen Adhäsion und damit weitere Zellfunktionen primär behindern, können so auch Fibronektin und weitere zelladhäsive Proteine ihren positiven Einfluss nicht ausüben. Daher sollte in Zukunft zunächst das Ziel verfolgt werden, die Netzwerkdicke herabzusetzen; z. B. durch eine Porenvergrößerung mithilfe beigesetzter Nanosilikate. [108] Im Anschluss an die Senkung der Netzwerkdicke wäre dann die Integration und kovalente Einbindung zelladhäsiver Proteine oder Peptide in Hydrogele sinnvoll, damit die Fibroblasten besser proliferieren können.

6 Zusammenfassung

Was vor einigen Jahren undenkbar erschien, könnte zukünftig möglich sein: Krankes Gewebe mit Gesundem ersetzen, das *in vitro* mit modernsten Biofabrikationstechniken hergestellt wird. Dabei werden bisherige Grenzen überschritten: Während lichtbasierte Biodruckverfahren wie die Zwei-Photonen-Polymerisation Auflösungen bis in den Nanometerbereich erzielen, ermöglicht der Volumetrische Biodruck (VB) den Druck zentimetergroßer Konstrukte in wenigen Sekunden. Diese Geschwindigkeiten erweisen sich unter Biodruckverfahren als konkurrenzlos und werden erreicht, da das Bioharz nicht konsekutiv, sondern zugleich vernetzt wird. Einschränkend gilt bislang nur der Mangel an geeigneten Bioharzen für den VB. Daher beschäftigt sich vorliegende Arbeit mit der Charakterisierung und Modifikation eines dafür geeigneten Bioharzes: Gelatine-Methacrylat (GelMA). Dank seiner Zusammensetzung ähnelt das etablierte Hydrogelsystem der Extrazellulärmatrix: Der Gelatine-Anteil ermöglicht Biokompatibilität und Bioaktivität durch zelladhäsive sowie degradierbare Aminosäure-Sequenzen. Zugleich können durch photovernetzbar Methacryloyl-Substituenten Konstrukte mit einer Formstabilität bei 37 °C erzeugt werden.

Zunächst wurde das Bioharz zellbiologisch charakterisiert, indem mit der embryonalen Mausfibroblasten-Zelllinie NIH-3T3 beladene GelMA-Zylinder gegossen, photopolymerisiert und kultiviert wurden. Im Verlauf einer Woche wurde die Zytokompatibilität der Gele anhand der Proliferationsfähigkeit (PicoGreen-Assay), des Metabolismus (CCK-8-Assay) und der Vitalität (Live/Dead-Assay) der Zellen beurteilt. Dabei wurden Polymerkonzentrationen von 6 – 8 % sowie GelMA-Harze zweier verschiedener Molekulargewichte verglichen. Alle hergestellten Gele erwiesen sich als zytokompatibel, 6 %-ige Gele ließen im Inneren jedoch zusätzlich eine beginnende Zellspreizung zu und ein niedriges GelMA-Molekulargewicht verstärkte die gemessene Proliferation. Die sich anschließende mechanische und physikalische Charakterisierung belegte, dass höher konzentrierte Gele einen größeren E-Modul aufwiesen und damit steifer waren. Eine Modifikation der Gele mit Fibronectin beeinflusste die Zellverträglichkeit weder positiv noch negativ und die Zugabe von Kollagen war wegen Entmischungseffekten nicht bewertbar. Es liegt die Vermutung nah, dass eine weitere Reduzierung der Polymerkonzentration und damit Verringerung der Gelsteifigkeit der Schlüssel für mehr Zellspreizung und -wachstum ist. Da jedoch die Druckbarkeit des Bioharzes die weitere Senkung des GelMA-Gehalts limitiert, sollten zunächst Methoden entwickelt werden, welche die Netzwerkdicke des GelMAs anderweitig herabsetzen.

7 Literaturverzeichnis

1. Zhu, N., et al., *A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019*. N Engl J Med, 2020. **382**(8): p. 727-733.
2. Krammer, F., *SARS-CoV-2 vaccines in development*. Nature, 2020. **586**(7830): p. 516-527.
3. Yi, H.G., et al., *Application of 3D bioprinting in the prevention and the therapy for human diseases*. Signal Transduct Target Ther, 2021. **6**(1): p. 177.
4. Kim, B.S., et al., *3D Cell Printing of Perfusible Vascularized Human Skin Equivalent Composed of Epidermis, Dermis, and Hypodermis for Better Structural Recapitulation of Native Skin*. Adv Healthc Mater, 2019. **8**(7): p. e1801019.
5. Park, J.Y., et al., *Development of a functional airway-on-a-chip by 3D cell printing*. Biofabrication, 2018. **11**(1): p. 015002.
6. Massa, S., et al., *Bioprinted 3D vascularized tissue model for drug toxicity analysis*. Biomicrofluidics, 2017. **11**(4): p. 044109.
7. Holmes, A.M., et al., *Rising to the challenge: applying biofabrication approaches for better drug and chemical product development*. Biofabrication, 2017. **9**(3): p. 033001.
8. Murphy, C.A., K.S. Lim, and T.B.F. Woodfield, *Next Evolution in organ-scale Biofabrication: Bioresin Design for Rapid high-resolution Vat Polymerization*. Adv Mater, 2022: p. e2107759.
9. Schwab, A., et al., *Printability and Shape Fidelity of Bioinks in 3D Bioprinting*. Chemical Reviews, 2020. **120**(19): p. 11028-11055.
10. Bernal, P.N., et al., *Volumetric Bioprinting of Organoids and Optically Tuned Hydrogels to Build Liver-Like Metabolic Biofactories*. Adv Mater, 2022. **34**(15): p. e2110054.
11. Rizzo, R., et al., *Optimized Photoclick (Bio)Resins for Fast Volumetric Bioprinting*. Adv Mater, 2021. **33**(49): p. e2102900.
12. Groll, J., et al., *Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field*. Biofabrication, 2016. **8**(1): p. 013001.
13. Orlando, G., et al., *Regenerative medicine and organ transplantation: past, present, and future*. Transplantation, 2011. **91**(12): p. 1310-7.
14. Guillemot, F., V. Mironov, and M. Nakamura, *Bioprinting is coming of age: report from the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux (3B'09)*. Biofabrication, 2010. **2**(1): p. 010201.
15. Groll, J., et al., *A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks*. Biofabrication, 2018. **11**(1): p. 013001.
16. Skardal, A. and A. Atala, *Biomaterials for integration with 3-D bioprinting*. Annals of biomedical engineering, 2015. **43**(3): p. 730-746.
17. Kumar, H. and K. Kim, *Stereolithography 3D Bioprinting*. Methods Mol Biol, 2020. **2140**: p. 93-108.
18. Levato, R., et al., *From Shape to Function: The Next Step in Bioprinting*. Adv Mater, 2020. **32**(12): p. e1906423.
19. Yue, K., et al., *Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels*. Biomaterials, 2015. **73**: p. 254-271.
20. Van Den Bulcke, A.I., et al., *Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels*. Biomacromolecules, 2000. **1**(1): p. 31-8.
21. Qin, X.-H., et al., *Additive manufacturing of photosensitive hydrogels for tissue engineering applications*. BioNanoMaterials, 2014. **15**(3-4).

22. DeForest, C.A. and K.S. Anseth, *Advances in Bioactive Hydrogels to Probe and Direct Cell Fate*. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, 2012. **3**(1): p. 421-444.
23. Place, E.S., N.D. Evans, and M.M. Stevens, *Complexity in biomaterials for tissue engineering*. Nat Mater, 2009. **8**(6): p. 457-70.
24. Ruoslahti, E. and M.D. Pierschbacher, *New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins*. Science, 1987. **238**(4826): p. 491-7.
25. Stratesteffen, H., et al., *GelMA-collagen blends enable drop-on-demand 3D printability and promote angiogenesis*. Biofabrication, 2017. **9**(4): p. 045002.
26. Romberger, D.J., *Fibronectin*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1997. **29**(7): p. 939-943.
27. Stichler, S., et al., *Thiol-ene Clickable Poly(glycidol) Hydrogels for Biofabrication*. Ann Biomed Eng, 2017. **45**(1): p. 273-285.
28. Tijore, A., et al., *Contact guidance for cardiac tissue engineering using 3D bioprinted gelatin patterned hydrogel*. Biofabrication, 2018. **10**(2): p. 025003.
29. Teixeira, L.S., et al., *Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: emerging strategies for tissue engineering*. Biomaterials, 2012. **33**(5): p. 1281-90.
30. Malda, J., et al., *25th Anniversary Article: Engineering hydrogels for biofabrication*. Adv Mater, 2013. **25**(36): p. 5011-28.
31. Bertlein, S., et al., *Thiol-Ene Clickable Gelatin: A Platform Bioink for Multiple 3D Biofabrication Technologies*. Adv Mater, 2017. **29**(44).
32. Muñoz, Z., H. Shih, and C.C. Lin, *Gelatin hydrogels formed by orthogonal thiol-norbornene photochemistry for cell encapsulation*. Biomater Sci, 2014. **2**(8): p. 1063-1072.
33. Santos, E., et al., *Biomaterials in cell microencapsulation*. Therapeutic applications of cell microencapsulation, 2010: p. 5-21.
34. Wüst, S., et al., *Tunable hydrogel composite with two-step processing in combination with innovative hardware upgrade for cell-based three-dimensional bioprinting*. Acta Biomater, 2014. **10**(2): p. 630-40.
35. Elomaa, L., et al., *Three-dimensional fabrication of cell-laden biodegradable poly(ethylene glycol-co-depsipeptide) hydrogels by visible light stereolithography*. J Mater Chem B, 2015. **3**(42): p. 8348-8358.
36. Warner, J., et al., *Design and 3D Printing of Hydrogel Scaffolds with Fractal Geometries*. ACS Biomater Sci Eng, 2016. **2**(10): p. 1763-1770.
37. Zhang, A.P., et al., *Rapid fabrication of complex 3D extracellular microenvironments by dynamic optical projection stereolithography*. Adv Mater, 2012. **24**(31): p. 4266-70.
38. Lallana, E., et al., *Click chemistry with polymers, dendrimers, and hydrogels for drug delivery*. Pharm Res, 2012. **29**(4): p. 902-21.
39. Schuurman, W., et al., *Gelatin-methacrylamide hydrogels as potential biomaterials for fabrication of tissue-engineered cartilage constructs*. Macromolecular bioscience, 2013. **13**(5): p. 551-561.
40. Fairbanks, B.D., et al., *Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility*. Biomaterials, 2009. **30**(35): p. 6702-7.
41. Zhu, M., et al., *Gelatin methacryloyl and its hydrogels with an exceptional degree of controllability and batch-to-batch consistency*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 6863.
42. Pepelanova, I., et al., *Gelatin-Methacryloyl (GelMA) Hydrogels with Defined Degree of Functionalization as a Versatile Toolkit for 3D Cell Culture and Extrusion Bioprinting*. Bioengineering (Basel), 2018. **5**(3).
43. Nichol, J.W., et al., *Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels*. Biomaterials, 2010. **31**(21): p. 5536-44.

44. Zhang, Y.S., et al., *Bioprinted thrombosis-on-a-chip*. Lab Chip, 2016. **16**(21): p. 4097-4105.
45. Derby, B., *Bioprinting: inkjet printing proteins and hybrid cell-containing materials and structures*. Journal of Materials Chemistry, 2008. **18**(47).
46. Ouyang, L., et al., *A Generalizable Strategy for the 3D Bioprinting of Hydrogels from Nonviscous Photo-crosslinkable Inks*. Adv Mater, 2017. **29**(8).
47. Hull, C., *US 4575330 A. Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography*, 1986. **11**.
48. Melchels, F.P., J. Feijen, and D.W. Grijpma, *A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering*. Biomaterials, 2010. **31**(24): p. 6121-30.
49. Melchels, F.P., J. Feijen, and D.W. Grijpma, *A poly(D,L-lactide) resin for the preparation of tissue engineering scaffolds by stereolithography*. Biomaterials, 2009. **30**(23-24): p. 3801-9.
50. Nguyen, A.K. and R.J. Narayan, *Two-photon polymerization for biological applications*. Materials Today, 2017. **20**(6): p. 314-322.
51. Moroni, L., et al., *Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology*. Trends Biotechnol, 2018. **36**(4): p. 384-402.
52. Lu, Y., et al., *A digital micro-mirror device-based system for the microfabrication of complex, spatially patterned tissue engineering scaffolds*. J Biomed Mater Res A, 2006. **77**(2): p. 396-405.
53. Wang, Z., et al., *A simple and high-resolution stereolithography-based 3D bioprinting system using visible light crosslinkable bioinks*. Biofabrication, 2015. **7**(4): p. 045009.
54. Billiet, T., et al., *A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering*. Biomaterials, 2012. **33**(26): p. 6020-41.
55. Bernal, P.N., et al., *Volumetric Bioprinting of Complex Living-Tissue Constructs within Seconds*. Adv Mater, 2019. **31**(42): p. e1904209.
56. Müller, M., et al., *Alginate Sulfate-Nanocellulose Bioinks for Cartilage Bioprinting Applications*. Ann Biomed Eng, 2017. **45**(1): p. 210-223.
57. Loterie, D., P. Delrot, and C. Moser, *Volumetric 3D printing of elastomers by tomographic back-projection*. 2018.
58. Loterie, D., P. Delrot, and C. Moser, *High-resolution tomographic volumetric additive manufacturing*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 852.
59. Lancaster, M.A. and J.A. Knoblich, *Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies*. Science, 2014. **345**(6194): p. 1247125.
60. Kim, J., B.K. Koo, and J.A. Knoblich, *Human organoids: model systems for human biology and medicine*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020. **21**(10): p. 571-584.
61. Koti, P., et al., *Use of GelMA for 3D printing of cardiac myocytes and fibroblasts*. J 3D Print Med, 2019. **3**(1): p. 11-22.
62. Lim, K.S., et al., *New Visible-Light Photoinitiating System for Improved Print Fidelity in Gelatin-Based Bioinks*. ACS Biomater Sci Eng, 2016. **2**(10): p. 1752-1762.
63. Lim, K.S., et al., *Promoting Cell Survival and Proliferation in Degradable Poly(vinyl alcohol)-Tyramine Hydrogels*. Macromol Biosci, 2015. **15**(10): p. 1423-32.
64. Sharma, P., et al., *Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions*. Journal of Botany, 2012. **2012**: p. 1-26.
65. Li, L., J. Eyckmans, and C.S. Chen, *Designer biomaterials for mechanobiology*. Nature Materials, 2017. **16**(12): p. 1164-1168.

66. Fan, C. and D.A. Wang, *Macroporous Hydrogel Scaffolds for Three-Dimensional Cell Culture and Tissue Engineering*. Tissue Eng Part B Rev, 2017. **23**(5): p. 451-461.
67. Kaur, G. and J.M. Dufour, *Cell lines*. Spermatogenesis, 2012. **2**(1): p. 1-5.
68. Schmitz, S., *Der Experimentator: Zellkultur*. 2011: Spektrum Akademischer Verlag.
69. MacDonald, C., *Development of new cell lines for animal cell biotechnology*. Crit Rev Biotechnol, 1990. **10**(2): p. 155-78.
70. Baudin, B., et al., *A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells*. Nat Protoc, 2007. **2**(3): p. 481-5.
71. Hu, C., et al., *Live-dead assay on unlabeled cells using phase imaging with computational specificity*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 713.
72. Kamiloglu, S., et al., *Guidelines for cell viability assays*. Food Frontiers, 2020. **1**(3): p. 332-349.
73. Riss, T., et al., *Cytotoxicity assays: in vitro methods to measure dead cells*. Assay Guidance Manual [Internet], 2019.
74. Aslantürk, Ö.S., *In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages*. Genotoxicity-A predictable risk to our actual world, 2018. **2**: p. 64-80.
75. Decherchi, P., P. Cochard, and G. P., *Dual staining assessment of Schwann cell viability within whole peripheral nerves using calcein-AM and ethidium homodimer*. Journal of Neuroscience Methods, 1997.
76. Seifabadi, Z.S., et al., *Assessment of viability of wharton's jelly mesenchymal stem cells encapsulated in alginate scaffold by WST-8 assay kit*. Medical Journal of Cell Biology, 2021. **9**(1): p. 42-47.
77. Chamchoy, K., et al., *Application of WST-8 based colorimetric NAD(P)H detection for quantitative dehydrogenase assays*. BMC Biochem, 2019. **20**(1): p. 4.
78. Ishiyama, M., et al., *A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability*. Talanta, 1997. **44**(7): p. 1299-1305.
79. Ng, K.W., D.T. Leong, and D.W. Hutmacher, *The challenge to measure cell proliferation in two and three dimensions*. Tissue engineering, 2005. **11**(1-2): p. 182-191.
80. Quent, V.M., et al., *Discrepancies between metabolic activity and DNA content as tool to assess cell proliferation in cancer research*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(4): p. 1003-13.
81. Blaheta, R.A., et al., *Development of an ultrasensitive in vitro assay to monitor growth of primary cell cultures with reduced mitotic activity*. Journal of immunological methods, 1998. **211**(1-2): p. 159-169.
82. Jones, L.J., et al., *Sensitive determination of cell number using the CyQUANT® cell proliferation assay*. Journal of immunological methods, 2001. **254**(1-2): p. 85-98.
83. American Type Culture Collection. *NIH/3T3 (ATCC CRL-1658)*. 2022 28.04.2022]; Available from: <https://www.atcc.org/products/crl-1658>.
84. DSMZ. *NIH-3T3 ACC 59*. 2022 26.07.2022]; Available from: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-59>.
85. ibidi. *Collagen Type I, rat tail, 10 mg/ml*. 2020 10.05.2022]; Available from: https://ibidi.com/img/cms/products/cells_reagents/R_5020X_CollagenI/IN_5020X_CollagenI_10mg.pdf.
86. Sigma-Aldrich. *96992 Cell Counting Kit - 8*. 2018 26.04.2022]; Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/document/s/381/017/96992dat.pdf>.

87. Thermo Fisher. *Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Reagent and Kit*. 2022 26.04.2022]; Available from: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp07581.pdf>.
88. Thermo Fisher. *Calcein AM*. 2020 28.04.2022]; Available from: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0019058_CalceinAM_UG.pdf.
89. Sigma-Aldrich. *Ethidium-Homodimer I -Lösung*. 2022 28.04.2022]; Available from: https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sial/e1903?gclid=Cj0KCQiA64GRBhCZARIsAHOLriLb--u_iVXENZUdYvqyieHRgNcatKTqvTDKbKzWho3LrBZeH7t2kOgaAvUUEALw_wcB.
90. Brunner, D., et al., *Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database*. *Altex*, 2010. **27**(1): p. 53-62.
91. Jochems, C.E.A., et al., *The Use of Fetal Bovine Serum: Ethical or Scientific Problem? Alternatives to Laboratory Animals*, 2002. **30**(2): p. 219-227.
92. Sigma-Aldrich. *Bovines Kälberserum*. 2022 28.04.2022]; Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sigma/12133c>.
93. Marescal, O. and I.M. Cheeseman, *Cellular Mechanisms and Regulation of Quiescence*. *Developmental Cell*, 2020. **55**(3): p. 259-271.
94. Lemons, J.M., et al., *Quiescent fibroblasts exhibit high metabolic activity*. *PLoS biology*, 2010. **8**(10): p. e1000514.
95. Solon, J., et al., *Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates*. *Biophys J*, 2007. **93**(12): p. 4453-61.
96. Lee, Y., et al., *Photo-crosslinkable hydrogel-based 3D microfluidic culture device*. *Electrophoresis*, 2015. **36**(7-8): p. 994-1001.
97. Zhao, X., et al., *Photocrosslinkable gelatin hydrogel for epidermal tissue engineering*. *Advanced healthcare materials*, 2016. **5**(1): p. 108-118.
98. Ibañez, R.I.R., et al., *3D-Printed Gelatin Methacrylate Scaffolds with Controlled Architecture and Stiffness Modulate the Fibroblast Phenotype towards Dermal Regeneration*. *Polymers*, 2021. **13**(15): p. 2510.
99. Wang, M., et al., *Engineering (bio) materials through shrinkage and expansion*. *Advanced Healthcare Materials*, 2021. **10**(14): p. 2100380.
100. Shin, H., B.D. Olsen, and A. Khademhosseini, *The mechanical properties and cytotoxicity of cell-laden double-network hydrogels based on photocrosslinkable gelatin and gellan gum biomacromolecules*. *Biomaterials*, 2012. **33**(11): p. 3143-3152.
101. Cao, Y., et al., *Synthesis of stiffness-tunable and cell-responsive Gelatin–poly (ethylene glycol) hydrogel for three-dimensional cell encapsulation*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2016. **104**(10): p. 2401-2411.
102. Berger, A.J., et al., *Scaffold stiffness influences breast cancer cell invasion via EGFR-linked Mena upregulation and matrix remodeling*. *Matrix Biol*, 2020. **85-86**: p. 80-93.
103. Tsang, K.M., et al., *Facile One-step Micropatterning Using Photodegradable Methacrylated Gelatin Hydrogels for Improved Cardiomyocyte Organization and Alignment*. *Adv Funct Mater*, 2015. **25**(6): p. 977-986.
104. Trujillo, S., et al., *Engineered 3D hydrogels with full-length fibronectin that sequester and present growth factors*. *Biomaterials*, 2020. **252**: p. 120104.
105. Berger, A.J., et al., *Decoupling the effects of stiffness and fiber density on cellular behaviors via an interpenetrating network of gelatin-methacrylate and collagen*. *Biomaterials*, 2017. **141**: p. 125-135.

106. ibidi. *Application Note 26: Fabrication of Collagen I Gels*. 2014 [10.05.2022]; Available from: https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AN26_CollagenI_protocols.pdf.
107. Ha, J.H., et al., *Conductive gelma–collagen–agnw blended hydrogel for smart actuator*. *Polymers*, 2021. **13**(8): p. 1217.
108. Xavier, J.R., et al., *Bioactive nanoengineered hydrogels for bone tissue engineering: a growth-factor-free approach*. *ACS Nano*, 2015. **9**(3): p. 3109-18.
109. Shi, Z., et al., *Nanohydroxyapatite, nanosilicate-reinforced injectable, and biomimetic gelatin-methacryloyl hydrogel for bone tissue engineering*. *International Journal of Nanomedicine*, 2021. **16**: p. 5603.

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

AlgGel	<i>Alginat-Gelatine</i>
ATP	<i>Adenosintri-phosphat</i>
BCS	<i>Bovines Kälberserum</i>
CaCl ₂	<i>Calciumchlorid</i>
Calcein AM	<i>Calcein Acetoxymethyl Ester</i>
CCK-8	<i>Cell Counting Kit-8</i>
DLP	<i>digitale Lichtprojektion</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure, Desoxyribonukleinsäure</i>
dsDNA	<i>doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
EthD-1	<i>Ethidium-Homodimer 1</i>
EZM	<i>Extrazellulär-matrix</i>
FCS	<i>Fetales Kälberserum</i>
FMZ	<i>Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde</i>
GelAGE	<i>Gelatine-Allylglycidylether</i>
GelMA	<i>Gelatine-Methacrylat</i>
HEPES	<i>2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure</i>
hMSC	<i>human mesenchymal stem cell</i>
LAP	<i>Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat</i>
MgCl ₂	<i>Mangesiumchlorid</i>
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid</i>
Na ₂ HPO ₄	<i>Dinatriumhydrogenphosphat</i>
NAD(P)H	<i>protoniertes Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)</i>
NaH ₂ PO ₄	<i>Natriumdihydrogenphosphat</i>
NaHCO ₃	<i>Natriumhydrogencarboant</i>
OD ₄₅₀	<i>optische Dichte, gemessen bei 450 nm</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PEG	<i>Polyethylenglycol</i>
PEGDA	<i>Polyethylenglycol Diacrylat</i>
RGD	<i>Arginin-Glycin-Asparaginsäure</i>
RM	<i>regenerative medicine</i>

rpm	<i>revolutions per minute</i>
SLA	<i>Stereolithographie</i>
TE	<i>tissue engineering</i>
TE-Puffer	<i>Tris-EDTA-Puffer</i>
VB	<i>volumetrischer Biodruck</i>
WST-8	<i>2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)- 2H-tetrazolium, water-soluble tetrazolium salt</i>

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Venn Diagramm zeigt Überschneidung von Biofabrikation, RM (regenerative medicine), TE (tissue engineering) und Additive Manufacturing.	4
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Synthese und Vernetzung von GelMA (Gelatine-Methacrylat).	12
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des Tintenstrahl- und Extrusionsdrucks.	14
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der SLA (Stereolithographie) und DLP (digitale Lichtprojektion).	16
Abbildung 5:	Schematische Darstellung des VB (Volumetrischer Biodruck).	19
Abbildung 6:	Metabolismus pro mg Gel von NIH-3T3-BCS und -FCS-Zellen in AlgGel-Hydrogelen (Durchlauf A).	49
Abbildung 7:	Absoluter DNA-Gehalt [ng] von NIH-3T3-BCS und -FCS-Zellen in AlgGel-Hydrogelen (Durchlauf A).	50
Abbildung 8:	Metabolismus pro mg Gel von NIH-3T3-BCS und -FCS-Zellen in 8 % GelMA-Hydrogelen (Durchlauf A).	51
Abbildung 9:	Absoluter DNA-Gehalt [ng] von NIH-3T3-BCS und -FCS-Zellen in 8 % GelMA-Hydrogelen (Durchlauf A).	52
Abbildung 10:	Mittelwert des absoluten DNA-Gehaltes [ng] von NIH-3T3-BCS-Zellen in 8 % GelMA-Hydrogelen der Batches CG-130 und CG-M.	53
Abbildung 11:	Feuchtgewicht von zellfreien GelMA-Hydrogelen der Konzentrationen 6, 7 und 8 %.	55
Abbildung 12:	E-Modul von zellfreien GelMA-Hydrogelen der Konzentrationen 6, 7 und 8 %.	55
Abbildung 13:	Metabolismus pro mg Gel von NIH-3T3-BCS-Zellen in 8, 7 und 6 % GelMA-Hydrogelen (Durchlauf A bis C).	57
Abbildung 14:	Absoluter DNA-Gehalt [ng] von NIH-3T3-BCS-Zellen in 8, 7 und 6 % GelMA-Hydrogelen (Durchlauf A bis C).	59

Abbildung 15:	Live/Dead-Färbung von NIH-3T3-BCS-Zellen auf 6, 7 und 8 % (m/v) GelMA-Hydrogelen.	60
Abbildung 16:	Live/Dead-Färbung von NIH-3T3-Zellen in 6 %, 7 % und 8 % (m/v) GelMA-Hydrogelen an Tag 1, 4 und 7.	61
Abbildung 17:	Live/Dead-Färbung von NIH-3T3-Zellen in 6 % (m/v) GelMA-Hydrogelen mit sternförmig gespreizten Zellen an Tag 7 (A) und Tag 4 (B).	62
Abbildung 18:	Makroskopische Aufnahmen von 8% GelMA-Hydrogele mit Kollagen und Ausflockungen.	63
Abbildung 19:	Metabolismus pro mg Gel von NIH-3T3-BCS-Zellen in 8, 7 und 6 % GelMA-Hydrogelen mit je 25 µg/ml Fibronectin (FN25).	65
Abbildung 20:	Metabolismus pro mg Gel von NIH-3T3-BCS-Zellen in 8, 7 und 6 % GelMA-Hydrogelen mit je 75 µg/ml Fibronectin (FN75).	65
Abbildung 21:	Absoluter DNA-Gehalt [ng] von NIH-3T3-BCS-Zellen in 8, 7 und 6 % GelMA-Hydrogelen mit je 25 µg/ml Fibronectin (FN25).	66
Abbildung 22:	Absoluter DNA-Gehalt [ng] von NIH-3T3-BCS-Zellen in 8, 7 und 6 % GelMA-Hydrogelen mit je 75 µg/ml Fibronectin (FN75).	67
Abbildung 23:	Live/Dead-Färbung von NIH-3T3-Zellen in 6 %, 7 % und 8 % (m/v) GelMA-Hydrogelen mit je 25 µg/ml Fibronectin (FN) an Tag 7.	68
Abbildung 24:	Metabolismus pro mg Gel von NIH-3T3-BCS und -FCS-Zellen in AlgGel-Hydrogelen (Durchlauf B).	92
Abbildung 25:	Absoluter DNA-Gehalt [ng] von NIH-3T3-BCS und -FCS-Zellen in AlgGel-Hydrogelen (Durchlauf B).	92
Abbildung 26:	Metabolismus pro mg Gel von NIH-3T3-BCS und -FCS-Zellen in 8 % GelMA-Hydrogelen (Durchlauf B und C).	93
Abbildung 27:	Absoluter DNA-Gehalt [ng] von NIH-3T3-BCS und -FCS-Zellen in 8 % GelMA-Hydrogelen (Durchlauf B und C).	94

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht technischer Geräte und Hilfsmittel.....	26
Tabelle 2:	Übersicht verwendeter Verbrauchsmaterialien.....	30
Tabelle 3:	Übersicht verwendeter Chemikalien.....	32
Tabelle 4:	Übersicht verwendeter Kits.....	34
Tabelle 5:	Übersicht verwendeter Zelllinien.....	35
Tabelle 6:	Übersicht verwendeter Zellkulturmedien.....	35
Tabelle 7:	Übersicht verwendeter Zellkulturseren.....	35
Tabelle 8:	Übersicht verwendeter Zellkulturzusätze.....	36
Tabelle 9:	Übersicht verwendeter Hydrogelkomponenten.....	37
Tabelle 10:	Übersicht verwendeter Hydrogelzusätze.....	37
Tabelle 11:	Pipettierschema der High-Range Standardreihe des PicoGreen-Assays.....	44

IV Anhang

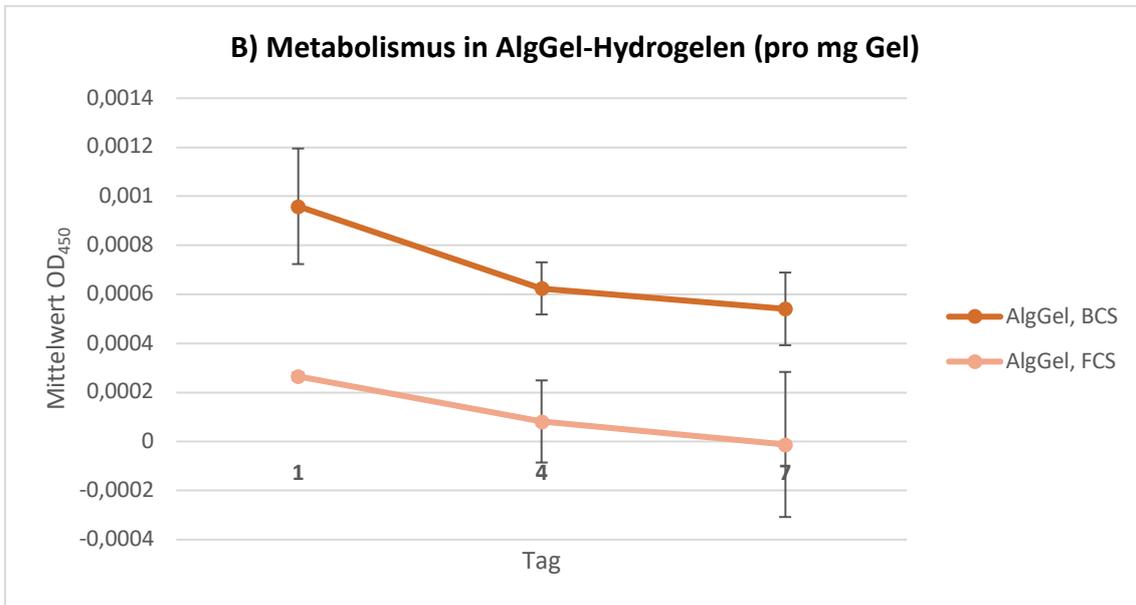


Abbildung 24: Metabolismus pro mg Gel von NIH-3T3-BCS und -FCS-Zellen in AlgGel-Hydrogelen (Durchlauf B). Messung mittels CCK-8-Kit an den Versuchstagen 1, 4 und 7. Mittelwert \pm Standardabweichung; $n = 6$.

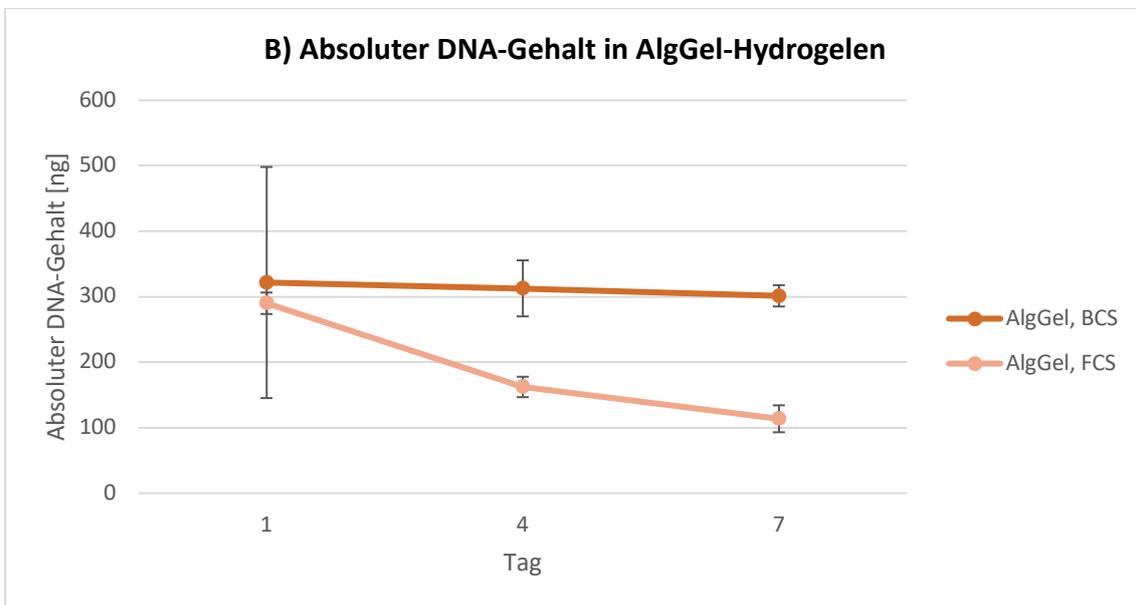


Abbildung 25: Absoluter DNA-Gehalt [ng] von NIH-3T3-BCS und -FCS-Zellen in AlgGel-Hydrogelen (Durchlauf B). Messung mittels PicoGreen (Probenverdünnung 1:8) an den Versuchstagen 1, 4 und 7. Mittelwert \pm Standardabweichung; $n = 6$.

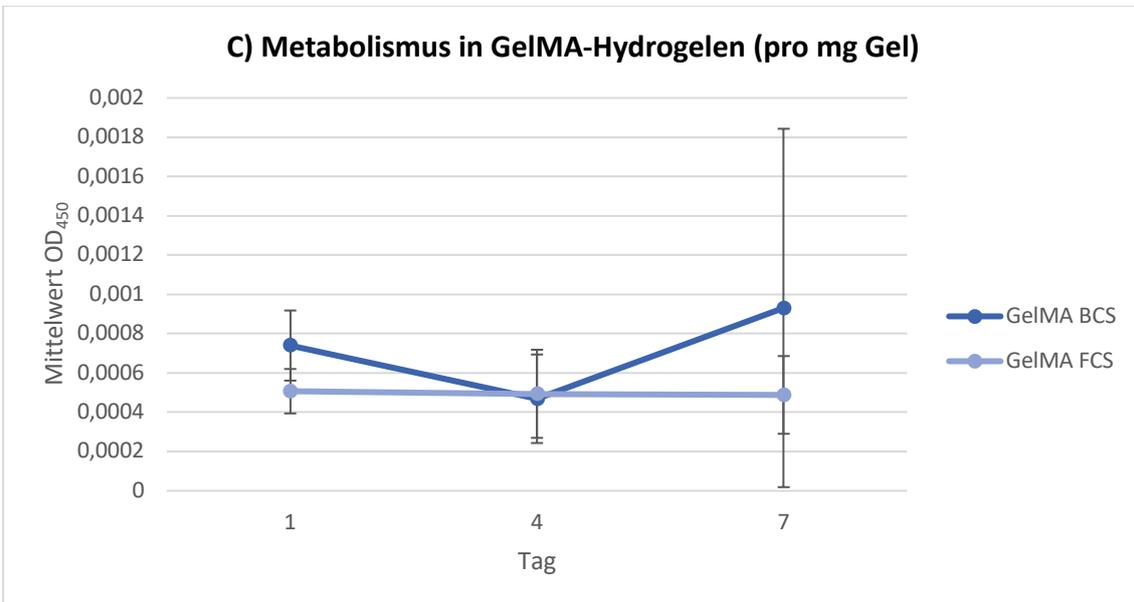
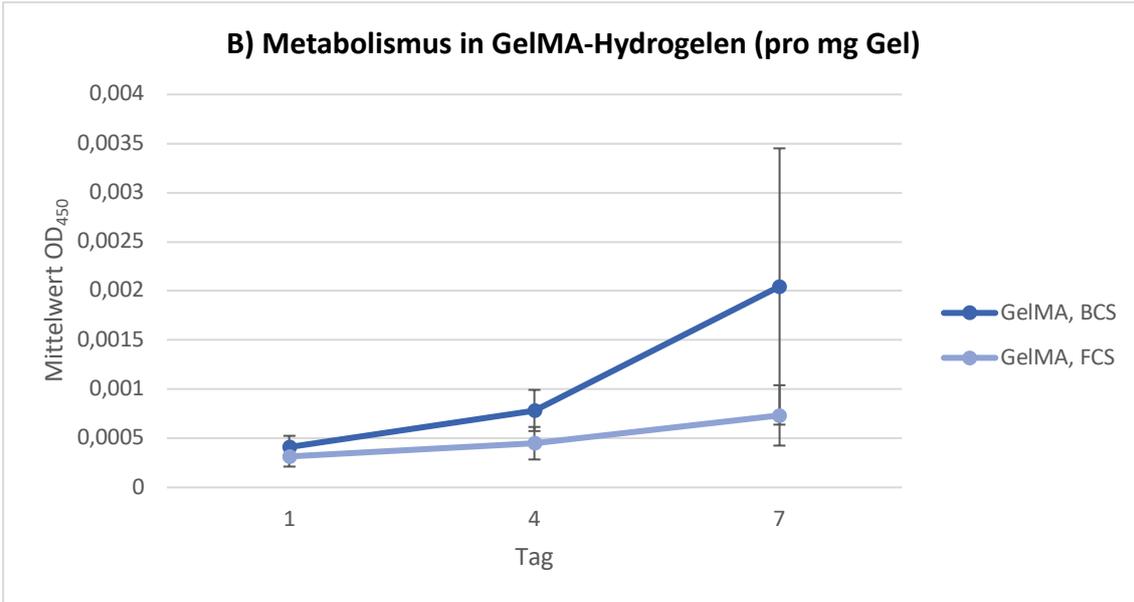


Abbildung 26: Metabolismus pro mg Gel von NIH-3T3-BCS und -FCS-Zellen in 8 % GelMA-Hydrogelen (Durchlauf B und C). Messung mittels CCK-8-Kit an den Versuchstagen 1, 4 und 7. Mittelwert \pm Standardabweichung; $n = 6$.

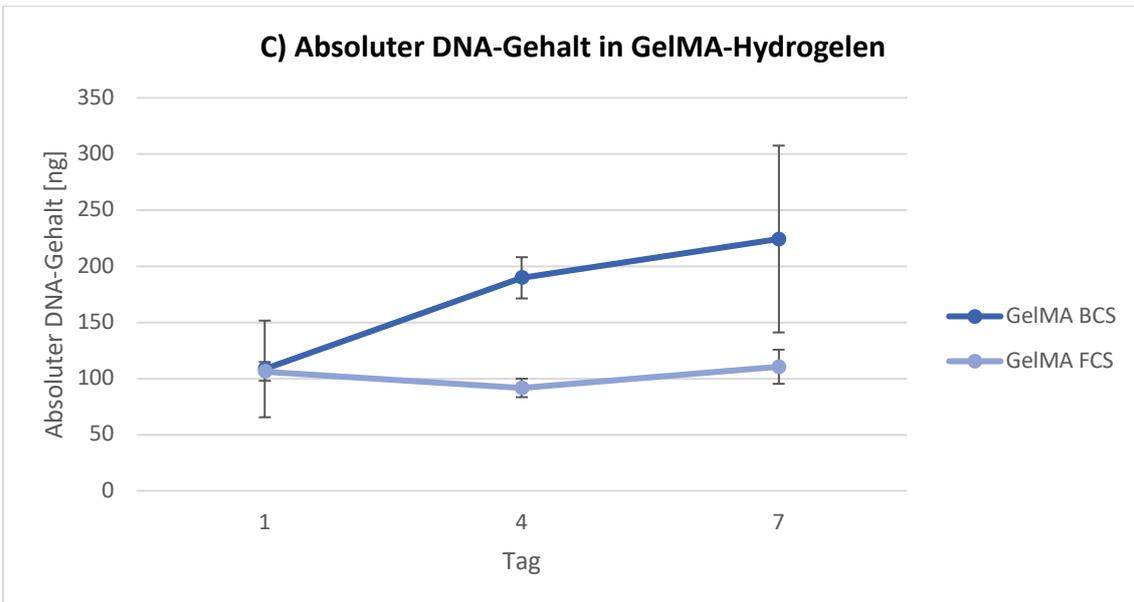
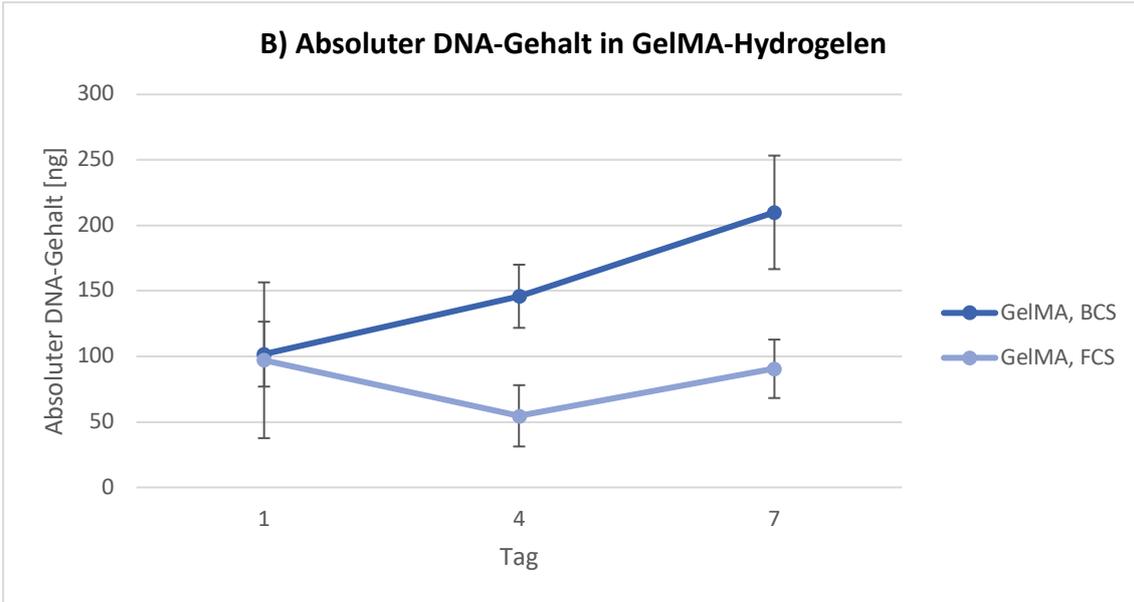


Abbildung 27: Absoluter DNA-Gehalt [ng] von NIH-3T3-BCS und -FCS-Zellen in 8 % GelMA-Hydrogelen (Durchlauf B und C). Messung mittels PicoGreen (Probenverdünnung 1:8) an den Versuchstagen 1, 4 und 7. Mittelwert \pm Standardabweichung; n = 6.

V Danksagung

Ich danke Jun. - Prof. Dr. Tomasz Jüngst und Dr. Tatjana Schilling für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnmedizin an der Universität Würzburg.

Weiterhin danke ich Alevtina Rosenthal, die bei Fragen zur Zellkultur immer ein offenes Ohr für mich gehabt hat.

Zuletzt danke ich Peter und meiner Familie für die Unterstützung, die mir in jeder Situation zuteil wird.