

Oligomer-vernetzte Hydrogele für die Biofabrikation

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Julia Carmen Matros
aus Neuss am Rhein

Neuss am Rhein, April 2025

aus dem Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Jun.-Prof. Dr. Michael Hacker
2. Prof. Dr. Jörg Breitzkreutz

Tag der mündlichen Prüfung: 25.08.2025

-Für meine Familie-

„Erfolg ist nicht der Schlüssel zum Glück. Glück ist der Schlüssel zum Erfolg. Wenn du liebst, was du tust, wirst du erfolgreich sein.“

-Albert Schweitzer

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Liste der Publikationen	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
Substanzen und Chemikalien	VII
Andere Abkürzungen	IX
1 Einleitung	1
1.1 Regenerative Medizin	1
1.2 Biomaterialien	2
1.3 Tissue Engineering Scaffolds (3D-Gerüststrukturen)	5
1.4 Hydrogele	6
1.4.1 Zweikomponenten-Hydrogele	10
1.5 Bioprinting	11
1.5.1 Biotinte	12
1.5.2 Zweikomponentendruck	15
1.6 Natürlichen Biopolymere	17
1.6.1 Gelatine	17
1.6.2 Imagel®	18
1.6.3 Chitosan	18
1.7 Synthetisiertes Oligomer	19
2 Ziele der Arbeit	23
3 Experimenteller Teil	29
3.1 Materialien	29
3.1.1 Chemikalien	29
3.1.2 Oligomer-Synthese	30
3.2 Methoden	32
3.2.1 Datenanalyse und graphische Darstellung	32
3.2.2 Charakterisierung Oligomer	32
3.2.2.1 NMR-Spektroskopie (¹ H-NMR)	32
3.2.2.2 Gelpermeationschromatographie (GPC)	32
3.2.2.3 Titration	33
3.2.2.3.1 Konduktometrische Titration (KT)	33
3.2.2.3.2 Brown-Fujimori-Titration (BFT)	34

3.2.3	Zusätzliche Aktivierung des Oligomers	34
3.2.4	Gelherstellung für die natürlichen Biopolymere	35
3.2.4.1	Gelherstellung Gelatine	35
3.2.4.2	Gelherstellung Imagerl®	36
3.2.4.3	Gelherstellung Chitosan	37
3.2.4.4	Nutzung elektronische Pipette	38
3.2.5	Charakterisierung der Hydrogele	38
3.2.5.1	Gelierungskinetik	38
3.2.5.2	Herauslösbare Anteile (Leachables) und Wassergehalt	39
3.2.5.3	Festigkeit der Hydrogel-Platten.....	40
3.2.5.4	Quervernetzungsgrad (TNBS-Assay)	41
3.2.6	Zellviabilität.....	42
3.2.6.1	Bestimmung der Zellviabilität.....	42
3.2.6.1.1	Allgemeine Versuche.....	42
3.2.6.1.2	Langzeitexperiment	44
3.2.6.1.3	Untersuchungen mit Mesenchymalen Stammzellen.....	44
3.2.6.2	Zellviabilitätsreagenzien	44
3.2.6.2.1	PrestoBlue®-Zellviabilitätsreagenz	44
3.2.6.2.2	WST-8-Zellviabilitätsreagenz	45
3.2.7	Zytotoxizität von DMSO und Oligomer.....	45
3.2.7.1	Hydrolyse des Oligomers.....	46
3.2.8	Entwicklung der Biotinten.....	46
3.2.8.1	Design of Experiments (DoE)	47
3.2.9	3D-Druck.....	49
3.2.9.1	Software	51
3.2.9.2	Vorversuch mit dem Imagerl®-Hydrogel.....	51
3.2.9.3	3D-Druck des Hydrogels als Biotinte	52
3.2.9.3.1	Massenschwankung der Hydrogele.....	55
3.2.9.4	Zellviabilität der gedruckten Konstrukte	56
3.2.9.5	Mikroskopische Untersuchung der gedruckten Konstrukte.....	57
3.2.9.6	Zubehörkonstruktion für den Zweikomponentendruck.....	57
3.2.9.7	Zweikomponentendruck.....	58
4	Ergebnisse und Diskussion.....	61
4.1	Charakterisierung des Oligomers.....	61

4.1.1	¹ H-NMR-Untersuchungen.....	62
4.1.2	Molekulargewichtsbestimmung mittels GPC.....	65
4.1.3	Titration.....	66
4.1.4	Korrelation: Molekulargewicht und Anzahl an Comonomeren	67
4.2	Zusätzliche Aktivierung des Oligomers	69
4.2.1	Gelierungskinetik	69
4.2.2	Titration.....	70
4.2.3	¹ H-NMR und GPC	71
4.3	Gelherstellung und Charakterisierung der Hydrogele mit verschiedenen natürlichen Biopolymeren	72
4.4	Vergleich der Hydrogele aus verschiedenen Biopolymeren mit unterschiedlichen Oligomeren	79
4.4.1	Gelierungskinetik	80
4.4.2	Frequenztest der Hydrogel-Platten.....	84
4.4.3	Trockengewicht und herauslösbare Anteile	86
4.4.4	Wassergehalt.....	88
4.4.5	Zusammenfassung	89
4.5	Eigenschaften und Variationen der Hydrogele.....	90
4.5.1	Gelatine-Hydrogele.....	90
4.5.1.1	Variation in der Art des Oligomers	91
4.5.1.2	Variation in dem Verhältnis der Komponenten zueinander ...	100
4.5.1.3	Variation im Lösungsmittel.....	107
4.5.1.4	Zusammenfassung.....	113
4.5.2	Image®-Hydrogele	115
4.5.2.1	Variation in der Basen-Konzentration	115
4.5.2.2	Variation in der Art des Oligomers	117
4.5.2.3	Variation in der Art des Lösungsmittels.....	119
4.5.2.4	Zusätzliche Variationen	121
4.5.2.5	Zusammenfassung.....	125
4.5.3	Chitosan-Hydrogele.....	127
4.5.3.1	Variation in der Art des Oligomers	129
4.5.3.2	Erhöhung der Autoklavierzeit.....	130
4.5.3.3	Variation in der Art des Lösungsmittels.....	131
4.5.3.4	Variation in der Konzentration der Oligomer-Lösung	132

4.5.3.5	Zusammenfassung	133
4.6	Entwicklung der Biotinten.....	135
4.6.1	Anpassung des Lösungsmittels für Gelatine und Oligomer	135
4.6.2	Anpassung des Verhältnisses und der Oligomer-Konzentration..	144
4.6.3	Anpassung der Konzentration an Triethanolamin (TEOA)	147
4.6.4	Auswahl der ersten Biotinte	154
4.6.5	Austausch der Base.....	155
4.6.6	Auswahl der zweiten Biotinte	158
4.6.7	Gelierungskinetik und Viskosität der Biotinten	159
4.6.8	Design of Experiment (DoE)	160
4.7	Zellviabilität	163
4.7.1	Vergleich der Zellviabilitätsreagenzien PrestoBlue® und WST-8 ..	163
4.7.2	Langzeitexperiment.....	166
4.7.3	Untersuchungen mit Mesenchymalen Stammzellen	167
4.7.3.1	Austausch von DMEM gegen α -MEM.....	168
4.7.3.2	Zellviabilitätsdaten	171
4.8	Zytotoxizität vom DMSO und Oligomer	172
4.9	3D-Druck.....	180
4.9.1	Vorversuch mit dem Imagel®-Hydrogel	180
4.9.2	3D-Druck des Gelatine-Hydrogels als Biotinte	182
4.9.2.1	Massenschwankung	184
4.9.2.2	Zellviabilität der gedruckten Hydrogel-Konstrukte.....	186
4.9.2.3	Mikroskopische Untersuchung der Hydrogel-Konstrukte	187
4.9.3	Zweikomponentendruck.....	189
4.9.3.1	Verbesserungsansätze	193
5	Zusammenfassung	195
6	Summary	201
7	Literaturverzeichnis	205
8	Danksagung	215
9	Eidesstaatliche Erklärung	219

Liste der Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits auf Konferenzen veröffentlicht.

Mündliche Präsentationen

- 1) **Matros JC**, Hacker MC. Anhydride-containing oligomers suitable for cross-linking gelatin and chitosan during 3D printing.
10. Mitteldeutschen Forum || 3D-Druck in der Anwendung an der Fakultät Ingenieurwissenschaften der HTWK Leipzig, Leipzig (Deutschland), 2023.

- 2) **Matros JC**, Auel T, Hacker MC. The way to 3D printing of two-component hydrogels consisting of anhydride-containing oligomers and gelatin or chitosan.
10th Polish German Symposium on Pharmaceutical Sciences (PolGerSym10), Düsseldorf (Deutschland), 2023.

Poster Präsentation

- 1) **Matros JC**, Hacker MC. A series of anhydride containing-oligomers suitable to cross-link gelatin and chitosan in injectable formulations.
4th European Conference on Pharmaceutics, Marseille (Frankreich), 2023.

**Publikationen im Rahmen wissenschaftlicher Kooperationen
(Koautorschaft)**

- 1) Wiebe-Ben Zakour KE, Kaya S, **Matros JC**, Hacker MC, Cheikh-Rouhou A, Spaniol K, et al. Enhancement of lacrimal gland cell function by decellularized lacrimal gland derived hydrogel. Biofabrication. 2024;16(2):025008.
- 2) Wiebe-Ben Zakour KE, Kaya S, Grumm L, **Matros J**, Hacker MC, Geerling G, et al. Modulation of Decellularized Lacrimal Gland Hydrogel Biodegradation by Genipin Crosslinking. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2024;65(5):24.

Abkürzungsverzeichnis

Substanzen und Chemikalien

Abkürzung	Bedeutung
AIBN	Azobis(isobutyronitril)
α -MEM	Zellkulturmedium (Engl. <i>Minimum Essential Medium</i>)
AMo	Acryloylmorpholin
β -GP	Beta-Glycerophosphat
COL	Partiell hydrolysiertes Kollagen-Protein
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAAm	Diacetonacrylamid
Dem.	Demineralisiertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DMEM	Zellkulturmedium (Engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fetales Kälberserum
GH	Gelatine-Hydroxyphenylpropionsäure
Glucosenon	Dihydrolevoglucosenon
GPT	Gelatine-Poly(ethylenglykol)-tyramin
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Demineralisiertes Wasser
HPA	2-Hydroxypropylacrylat
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
MA	Maleinsäureanhydrid
MEM	Minimum Essential Medium
NaOH	Natriumhydroxid
NBP	<i>N</i> -Butyl-2-Pyrrolidon
NiPAAm	<i>N</i> -Isopropylacrylamid
NMPO	3-Hydroxy-1-Methylpiperidin
N ₂	Stickstoff

Abkürzungsverzeichnis

NVP	N-Vinyl-Pyrrolidon
oPDMA	Oligo (PEDAS-co-DAAm-co-MA)
oPNMA	Oligo (PEDAS-co-NiPAAm-co-MA)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Engl. phosphate-buffered saline</i>)
PEDAS	Pentaerythritoldiacrylat-Monostearat
PEG	Polyethylenglykol
PETG	Polyethylenterephthalat, Glykol-modifiziert
PG	Propylenglykol
RK	Rattenschwanz-Kollagen
SA	Stearylacrylat
TEOA	Triethanolamin
THF	Tetrahydrofuran
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure

Andere Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
% M/M	Massenprozent
% V/V	Volumenprozent
BFT	Brown-Fujimori-Titration
Bzw.	beziehungsweise
CAD	<i>Engl. computer-aided design</i>
CCC	<i>Engl. Central composite circumscribed</i>
Co.	Comonomere
D	Dispersität
EZM	Extrazelluläre Matrix
G´	Speichermodul
G´´	Verlustmodul
GPC	Gaspermeationschromatographie
h	Stunden
hASCs	Humane adipöse Stammzellen (<i>Engl. Human adipose stem cells</i>)
Hz	Hertz
KT	Konduktometrische Titration
M	Molarität
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
µm	Mikrometer
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
Mn	Zahlenmittleres Molekulargewicht
Mw	Gewichtsmittleres Molekulargewicht
MW	Mittelwert
N	Normalität
NG	Nassgewicht
nm	Nanometer

Abkürzungsverzeichnis

NMR	Kernresonanzspektroskopie
P	Phasenwinkel
PTFE	Polytetrafluorethylen
Q^2	Güte der Vorhersage
RFU	Relative Fluoreszenzeinheit (<i>Engl. relative fluorescence unit</i>)
RGD	Aminosäuresequenz aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure
R^2	Bestimmtheitsmaß
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
STL	Stereolithografie
TG	Trockengewicht
Trpf.	Tropfen

1 Einleitung

1.1 Regenerative Medizin

Das Feld der regenerativen Medizin bietet Möglichkeiten Gewebe oder Organe zu ersetzen oder zu heilen, die durch verschiedene Einflüsse geschädigt worden sind. Dazu gehört zum Beispiel das Alter, Krankheiten, Schädigungen durch Traumata oder auch angeborene Defekte [1]. Die Anwendungen der regenerativen Medizin zeigen Erfolge bei Patienten mit Verletzungen, Organversagen im Endstadium und bei einer Vielzahl anderer klinischer Probleme. Bisher war die einzige Lösung für Patienten, die an erkrankten oder verletzten Organen litten, eine Organspende über die Transplantation [2]. Diese Lösung stellt einige Probleme dar, da es nur noch eine limitierte Anzahl an Organspendern in der Bevölkerung gibt und die Organtransplantation oft zu immunologischen Komplikationen führen kann. Der Einsatz der regenerativen Medizin mit sämtlichen Strategien kann diese Probleme möglicherweise umgehen. Diese umfassen die Verwendung von Materialien und Zellen, sowie Kombinationen davon, die fehlendes Gewebe strukturell und funktionell ersetzen sollen (Tissue Engineering) oder zur Gewebeheilung des verletzten Gewebes beitragen [1]. Die Regeneration von Körpergeweben mit lebenden Zellen, Gerüsten und Wachstumsfaktoren zum Beispiel kann in vivo oder ex vivo erfolgen. Bei in vivo nutzt der Körper eigene Systeme, um das Gewebe und die Organe mit Hilfe biologischer Materialien wieder zellulär zu regenerieren („Selbstheilung“). Bei ex vivo hingegen, mit dem Tissue Engineering als Teilgebiet der Regenerativen Medizin (Abbildung 1), wird die Aussaat von Zellen auf und/oder in ein bereits tragendes Gerüst (Scaffold) genutzt [3].

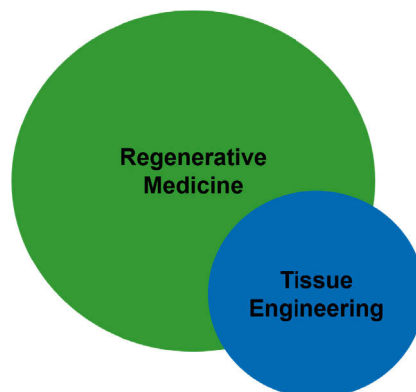


Abbildung 1: Diagrammatische Illustration der Beziehung zwischen regenerativer Medizin und Tissue Engineering, modifiziert nach [3].

Beim Tissue Engineering handelt es sich um ein interdisziplinäres und multidisziplinäres Gebiet [4]. Die beiden grundlegenden Komponenten zur Schaffung neuer Gewebe und Organe im Tissue Engineering sind die Zellen auf der einen Seite und die Biomaterialien auf der anderen Seite. Die Einführung der Zellen regt die Regeneration an, fördert die Gefäßneubildung und sorgt für die Produktion von Hormonen und Wachstumsfaktoren, während der Einsatz der Biomaterialien die Richtung des neuen Gewebewachstums lenkt, die richtige räumliche Umgebung für die Wiederherstellung der Gewebestruktur- und funktion bietet und eventuell bioaktive Faktoren einbringt [2]. Die US-Behörde Food and Drug Administration (FDA) hat bereits eine Vielzahl an Therapien zugelassen, die im Handel erhältlich sind und in dieses Feld fallen. Dabei handelt es sich um autologe (körpereigene Zellen) oder allogene Spenderzellen, die differenziert sind und noch proliferative Kapazität zeigen. Ein Beispiel stellt Carticel dar, ein zugelassenes Biologikum im orthopädischen Bereich. Es nutzt autologe Chondrozyten für die Behandlung von fokalen Gelenkknorpeldefekten. Die Zellen werden aus dem Gelenkknorpel des Patienten entnommen, ex vivo proliferiert und an den Ort der Verletzung implantiert [3].

1.2 Biomaterialien

Die Schlüsselkomponenten für das Tissue Engineering in der regenerativen Medizin sind Biomaterialien. Der Erfolg vieler Strategien in der Regenerativen Medizin hängt von der Fähigkeit ab geeignete Biomaterialien zu entwickeln und herzustellen, die die Zellen während der Gewebeheilung unterstützen und leiten. Das amerikanische National Institute of Health definiert ein Biomaterial als „jede Substanz oder Kombination von Substanzen, außer Arzneimitteln, synthetischen oder natürlichen Ursprungs, die für einen beliebigen Zeitraum verwendet werden kann und die ein Gewebe, ein Organ oder eine Funktion des Körpers teilweise oder vollständig ergänzt oder ersetzt, um die Lebensqualität des Einzelnen zu erhalten oder zu verbessern“. Um eine potenzielle Immunreaktion des Körpers auf die implantierten Biomaterialien zu vermeiden, müssen vorher die Zytotoxizität und Biokompatibilität des Biomaterials getestet werden [5]. Die Biomaterialien können in vier große Klassen eingeteilt werden, wie Abbildung 2 zeigt.

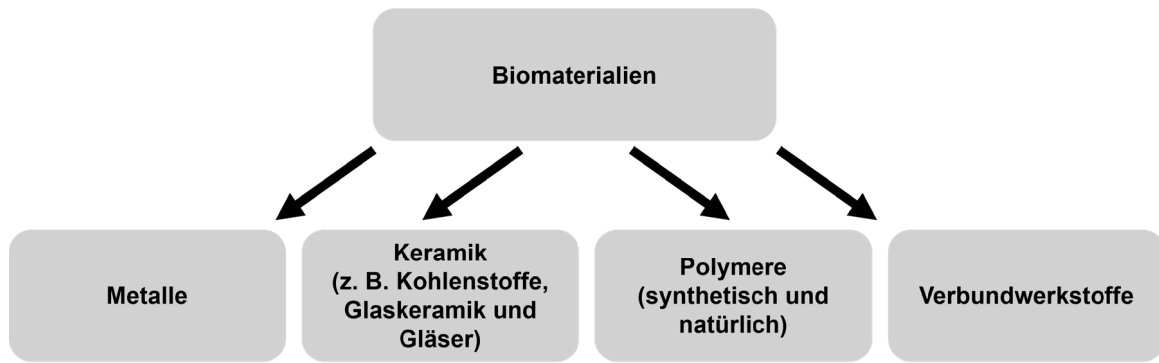


Abbildung 2: Aufteilung der Biomaterialien in vier Klassen [5, 6].

Metallische Implantate finden in der Biomedizin vielfältige Anwendung, beispielsweise als Klammern, Drähte oder Zahnimplantate. Typische Beispiele für metallische Materialien sind nichtrostender Stahl, Kobalt-, Titan- und Magnesiumlegierungen sowie Formgedächtnislegierungen aus Nickel-Titan, Silber, Tantal und Zirkonium [7]. Die Nachteile der metallischen Implantate finden sich in der Erfüllung der Biokompatibilität, der Korrosionsanfälligkeit in der physiologischen Umgebung und dem großen Unterschied in den mechanischen Eigenschaften des biologischen Gewebes [6]. Die Biokompatibilität stellt die Grundvoraussetzung für die klinische Anwendung eines biomedizinischen Implantats dar. Die Anforderungen an metallische Implantate beinhalten daher, dass sie aufgrund von Korrosion oder Ermüdungsversagen von Strukturkomponenten keine toxischen Metallionen freisetzen und infolgedessen zu keinen messbaren entzündlichen oder allergischen Reaktionen führen [7]. Wie auch die metallischen Implantate finden auch die Keramiken den größten Anteil in orthopädischen und zahnmedizinischen Anwendungen. Im Gegensatz zu den Metallen, zeigen sie eine höhere Dichte, eine höhere Verschleißfestigkeit, eine verbesserte Biokompatibilität und glänzendere Oberflächen für die Optik [5]. Die wichtigsten Anwendungsgebiete sind Zahnteile, Beschichtungen, Knochen- und Knochenfüllungen und medizinische Werkzeuge bzw. Implantate. Die Keramiken, die als Biomaterialien verwendet werden, umfassen zum Beispiel Aluminiumoxid, Titanoxide, Calciumphosphat oder Bioglas. Eine geringe Schlagfestigkeit sowie Verarbeitungs- und Herstellungsschwierigkeiten stellen die größten Nachteile dieser Gruppe an Biomaterialien dar. Bei den Polymeren, die aus einer großen Anzahl an kleinen wiederkehrenden Einheiten bestehen, haben die synthetischen- und die natürlichen Polymere ihre Anwendbarkeit in dem Gebiet der regenerativen

Medizin gezeigt [6]. Vor allem werden sie, aufgrund ihrer Flexibilität in der Anpassung der chemischen und physikalischen Eigenschaften, zur Regenerierung und dem Tissue Engineering von verschiedenen Geweben, wie dem Muskel-Skelett-System, dem Herz-Kreislauf-System, dem Nervengewebe und dem dermalen Gewebe (siehe unten Kollagen) genutzt [5]. Die synthetischen Polymere umfassen zum Beispiel Polyethylen (PE), Polypropylen (PP), Polyethylenterephthalat (PET), Polytetrafluoroethylen (PTFE), Polyvinylalkohol (PVA) für die Schläuche und Blutkonservenbeutel im Bereich der klinischen Anwendung und der biomedizinischen Wissenschaft und biologisch abbaubares Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) als resorbierbares chirurgisches Nahtmaterial und als Fixierungsvorrichtungen in orthopädischen Anwendungen. Bei den natürlichen Biopolymeren lassen sich vor allem Alginat, Kollagen, Agarose, Chitosan, Gelatine und Hyaluronsäure finden. Kollagen hat sich zum Beispiel mit viel Potenzial im Bereich der Hautgeneration gezeigt, da es ein natürlicher Bestandteil der Haut ist [6]. Bei den Verbundwerkstoffen handelt es sich um eine heterogene Anordnung aus zwei oder mehr Materialien mit unähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften. Das Ziel ist die Kombination aus Materialien, wo man die Nachteile der einzelnen Komponenten minimiert und die Vorteile nutzt. Die Eigenschaften des resultierenden Produktes lassen sich zum Beispiel leicht durch Konzentrationsänderungen der einzelnen Bestandteile anpassen. Die häufigsten Kombinationen umfassen Polymere mit keramischen Materialien. Ein Beispiel ist, das mit Kohlenstofffasern verstärkte, Polyetheretherketon (PEEK) für Schrauben und Knochenplatten in der Chirurgie. Um das neu gebildete Gewebe später strukturell unterstützen zu können [8], ist es bei der Verwendung der Biomaterialien im Tissue Engineering von großer Bedeutung diese als Gerüste sogenannte Scaffolds (siehe Kapitel 1.3) zu verwenden [5].

1.3 Tissue Engineering Scaffolds (3D-Gerüststrukturen)

Um im Tissue Engineering ein geeignetes Umfeld für die Regeneration von Gewebe und Organen zu schaffen, braucht man poröse 3D-Gerüste (Scaffolds), die als Vorlage für die Gewebeneubildung dienen. In der Regel werden diese Gerüste mit einem Wachstumsfaktor besiedelt oder biophysikalischen Stimuli in Form eines Bioreaktors ausgesetzt.

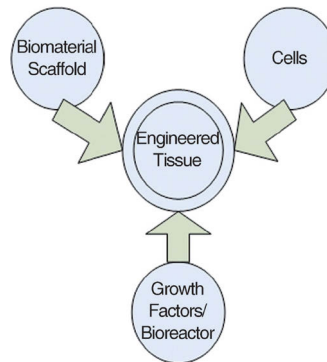


Abbildung 3: Dreiklang aus den Zellen, den Signalen wie dem Wachstumsfaktor oder dem Bioreaktor und dem Biomaterial bzw. dem Scaffold als Gerüst für die Gewebeneubildung [9].

Abbildung 3 zeigt den Dreiklang zwischen dem 3D-Gerüst aus dem Biomaterial, den Zellen und dem Stimulus für die Gewebeneubildung. Die Gerüste, welche mit Zellen besiedelt wurden, können in vitro kultiviert werden, bevor sie implantiert werden oder sie werden direkt in die verletzte Stelle implantiert, wo körpereigene Systeme die Regeneration induzieren [9]. Um implantiert werden zu können, müssen die 3D-Gerüste vier Grundbedürfnisse erfüllen (4F): Form, Funktion, Formgebung bzw. Gerüstbildung und Fixierung. Die Form bedeutet, dass das 3D-Gerüst zu der ursprünglichen Anatomie des Gewebes passen muss. Die Funktion beschreibt die Übernahme der alltäglichen funktionellen Anforderungen, die es in dem Gewebedefekt zu erfüllen gibt, bevor das neu gebildete Gewebe dies übernehmen kann. Der Begriff Formgebung bzw. Gerüstbildung steht für die Zufuhr geeigneter Biologika und der geeigneten Umgebung für den Stofftransport und die Fixierung beschreibt die stabile Form des 3D-Gerüsts für die Implantation durch zum Beispiel einen Chirurgen [10]. Neben den 4F spielen zudem noch weitere Eigenschaften eine bedeutsame Rolle, um die Eignung des 3D-Gerüsts für die Verwendung im Tissue Engineering zu überprüfen. Zellkompatibilität des 3D-Gerüsts bedeutet, dass die Zellen an dem Gerüst anhaften müssen, durch das Gerüst wandern können und eine Proliferation der Zellen in dem Gerüst möglich

ist. Da die Zellen das implantierte 3D-Gerüst im Laufe der Zeit übernehmen und ersetzen sollen, muss das Gerüst auch biologisch abbaubar sein. Die Abbauprodukte dürfen aus diesem Grund nicht toxisch sein und müssen den Körper einfach wieder verlassen können. Bei den mechanischen Eigenschaften ist wie bei der „Fixierung“ schon aufgeführt wichtig, dass das 3D-Gerüst einfach implantiert werden kann und idealerweise an der implantierten Stelle, die gleichen mechanischen Eigenschaften aufweist, wie das vorhandene oder ersetzte Gewebe. Neben den mechanischen Eigenschaften sollte das 3D-Gerüst auch eine poröse, gut vernetzte Struktur aufweisen, um die zelluläre Penetration und Diffusion der Nährstoffe zu den Zellen aber auch den Abtransport der oben genannten Abbauprodukte zu ermöglichen. Für die spätere Entwicklung des 3D-Gerüsts als kommerzielles Produkt, müssen zusätzlich Faktoren berücksichtigt werden, die die Entwicklung und Herstellung nach GMP-Standard (Good Manufacturing Practice) ermöglichen [9]. Die 3D-Gerüststrukturen spielen damit eine zentrale Rolle im Tissue Engineering [4]. Das Ziel des 3D-Gerüsts aus dem Biomaterial ist nach der Anlagerung, Vermehrung und Differenzierung der Zellen die Bildung einer extrazellulären Matrix (EZM) für die strukturelle Integrität des Gewebes. Gut darstellbar ist die EZM über 3D-zelluläre Hydrogele [11].

1.4 Hydrogele

Der Begriff Hydrogel bezeichnet ein dreidimensionales Netzwerk aus Polymeren, synthetischer oder natürlicher Herkunft, das aufgrund des hohen Wassergehaltes ein hohes Maß an Flexibilität aufweist. Hydrogele können unter physiologischen Bedingungen eine große Menge an Wasser oder anderen biologischen Flüssigkeiten binden und ähneln aufgrund ihrer weichen, elastischen Konsistenz dem lebenden Gewebe wie der extrazellulären Matrix (EZM) [12, 13]. Die 3D-Organisation und biochemische Zusammensetzung der EZM ist für jeden Gewebetyp charakteristisch und besteht aus den strukturellen und funktionellen Molekülen, die von ansässigen Zellen abgesondert werden. Mit vielen Hydrogelen wird versucht die biochemische Komplexität des nativen Gewebes der EZM aus Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen nachzuahmen [13, 14]. Durch ihre hydrophilen Polymerketten besitzen Hydrogele auch weitgehend einstellbare chemische Eigenschaften, die auf ihre Funktionalität hin, angepasst werden

können [15]. Dennoch können Hydrogele auch eine Reihe von Nachteilen aufweisen. Hydrogele vom natürlichen Ursprung zeigen eine schnelle Abbaubarkeit und eine geringe mechanische Festigkeit, während synthetische Hydrogele dagegen biologisch inert sind und keine körpereigenen Faktoren aufweisen [16]. Zudem können beispielsweise Hydrogele, die durch Polymerisation hergestellt worden sind, nicht umgesetzte Monomere, Initiatoren, Vernetzer oder andere Nebenprodukte enthalten, die toxisch sein könnten. Ein Beispiel für ein solches Hydrogel könnte die radikalisch initiierte Polymerisation von Acrylsäure mit einem Quervernetzer, wie Methylenbisacrylamid, sein [12]. Für die Herstellung eines Hydrogels wird, wie in dem oberen Beispiel auch beschrieben worden ist, die Quervernetzung der Komponenten benötigt. Dabei wird zwischen der chemischen Vernetzung, wo ein Quervernetzer die Komponenten kovalent miteinander verbindet, und der physikalischen Quervernetzung, wo es zum Beispiel zu hydrophoben Wechselwirkungen, ionischen Komplexen oder Wasserstoffbrückenbindungen kommt, unterschieden. Aufgrund von Konformationsänderungen sind physikalische Hydrogele reversibel, während kovalent vernetzte Hydrogele aufgrund ihrer Konformationsänderung permanent und irreversibel sind [17]. In Abbildung 4 sieht man Beispiele für die chemische und physikalische Quervernetzung dargestellt.

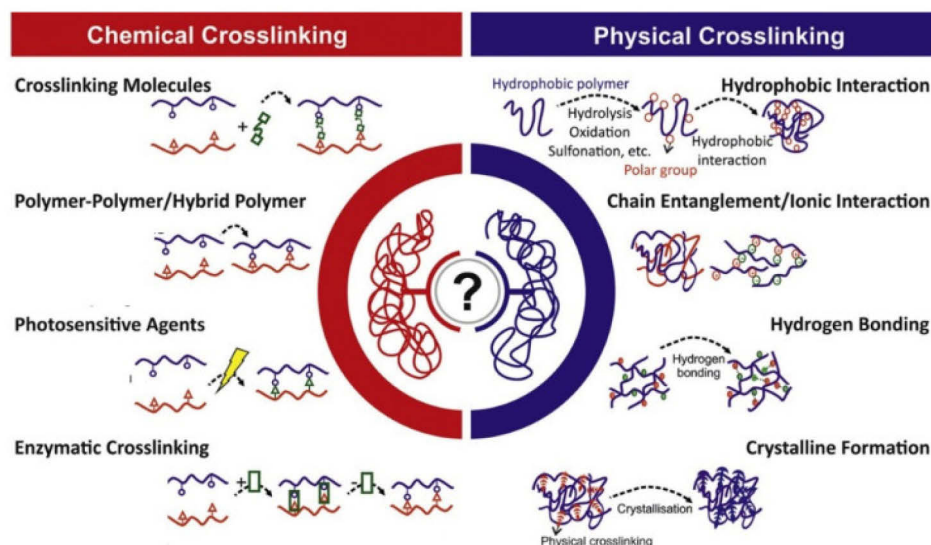


Abbildung 4: Verschiedene Arten der physikalischen (rechts) und chemischen (links) Quervernetzung in Hydrogelen [17].

Bei den chemisch vernetzten Hydrogelen kann die Quervernetzung durch thermische Polymerisation, Photopolymerisation initiiert durch eine Lichtquelle, enzymatische Vernetzung oder verschiedene Methoden der Polymerkonjugation wie zum Beispiel der „Klick“-Chemie stattfinden. Die Vorteile der Polymerkonjugation sind, dass keine Initiatoren wie bei der Photopolymerisation und der enzymatischen Vernetzung zugegeben werden müssen. Wie oben schon beschrieben umfasst die physikalische Quervernetzung die Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Interaktionen, hydrophobe Interaktionen und die Kristallisierung. Ein Beispiel für die Kristallisierung stellt das Polyvinylalkohol/Alginat-hydrogel dar, das durch Gefrier-Tau-Zyklen und anschließende Behandlung mit NaCl-Lösung gewonnen wird. Vergleicht man die chemische und physikalische Quervernetzung zeigen die Hydrogele, die physikalisch quervernetzt wurden, in der Regel eine geringere mechanische Festigkeit und Stabilität aufgrund der Reversibilität. Auf der anderen Seite ist kein Quervernetzer enthalten, der potenziell toxisch oder schädlich sein kann [17]. Nach der Quervernetzung der verschiedenen Polymerketten zeigen die entstandenen Netzwerke ein viskoelastisches und manchmal ein rein elastisches Verhalten [12]. Aus diesem Grund ist die rheologische Charakterisierung von Hydrogelen, neben der Bestimmung der Viskosität, von Bedeutung. Besonders der Amplitudentest, der Frequenzsweep und der zeitabhängige Oszillationstest spielen eine große Rolle bei der Charakterisierung von Hydrogelen. Der Amplitudentest bestimmt bei zunehmender oszillierender Spannung und konstanter Frequenz den linear viskoelastischen Bereich (LVR), bei dem der Speichermodul (G') und der Verlustmodul (G'') unabhängig von der zunehmenden Dehnung sind. Bei dem Frequenztest werden der Speichermodul (G') und der Verlustmodul (G'') über einen bestimmten Frequenzbereich verglichen, worüber Aufschlüsse über die viskoelastischen Eigenschaften gewonnen werden können. Um die strukturellen Veränderungen des Hydrogels bzw. der einzelnen Komponenten über einen bestimmten Zeitraum, wie zum Beispiel während des 3D-Druckes, beschreiben zu können, wird der zeitabhängige Oszillationstest verwendet (Abbildung 5). Beispielsweise wirkt sich die Gelierung auf die rheologischen Eigenschaften aus und kann so über den Speichermodul (G') und den Verlustmodul (G'') bestimmt

werden, wie Abbildung 5 zeigt. Läuft die Gelierungsreaktion nicht zu schnell ab, kann man am Kreuzungspunkt von G' und G'' den Gelierungspunkt erkennen [17]

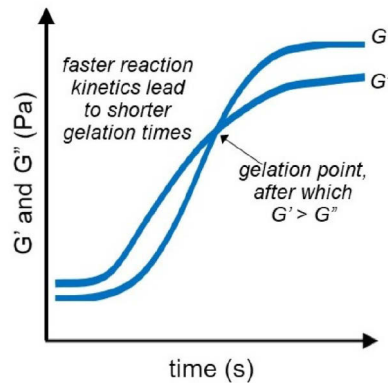


Abbildung 5: Gelierungsreaktion eines Hydrogels im Laufe der Zeit mit Kreuzungspunkt von G' und G'' [17].

Abbildung 6 zeigt, anhand eines Tumormodells, was insgesamt zu einem kompletten Netzwerk eines Hydrogel-Modells in Kultur dazugehört, wobei verschiedene Zelltypen (Tumorzellen, Mesenchymale Zellen, Immunzellen oder vaskuläre Zellen) in das Hydrogel eingekapselt werden können. Für die mechanische Festigkeit und Steifigkeit des Hydrogels sind die Polymer-Konzentration, das Molekulargewicht, die Quervernetzungsichte und die Bioabbaubarkeit von Bedeutung. Neben dem Polymer, welches die Gelstruktur bildet, sind biochemische Zellsignalmoleküle wichtig, wie verschiedene Zelladhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren und Zytokine, um die Signalübertragung im Hydrogel zu stimulieren [18].

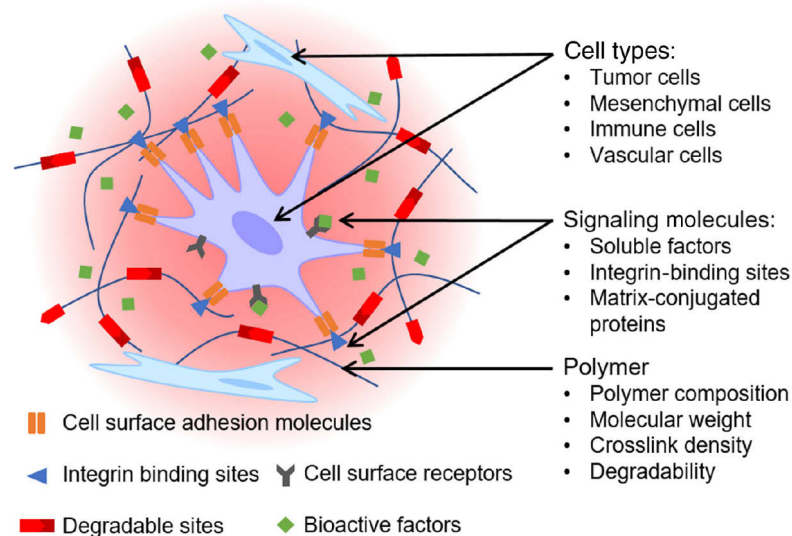


Abbildung 6: Gewebetechnisch hergestelltes 3D-Tumormodell in Kultur [18].

1.4.1 Zweikomponenten-Hydrogele

Hydrogele, die durch Mischung von zwei Komponenten entstehen, werden als Zweikomponenten-Hydrogele bezeichnet. Der Vorteil gegenüber den anderen Quervernetzungsstrategien ist, dass es keine Änderung der Umgebungsbedingungen, wie den pH-Wert, die Temperatur oder die Ionenstärke oder den Zusatz von toxischen Quervernetzern, geben muss [19]. Für diese Arbeit werden die Zweikomponenten-Hydrogele durch die Quervernetzung von synthetischen Oligomeren mit Anhydrid-Funktionalitäten und Amin-haltigen Makromolekülen, wie zum Beispiel gelatinöse Peptide, über eine schnelle Anhydrid-Amin-Konjugation hergestellt (Abbildung 7).

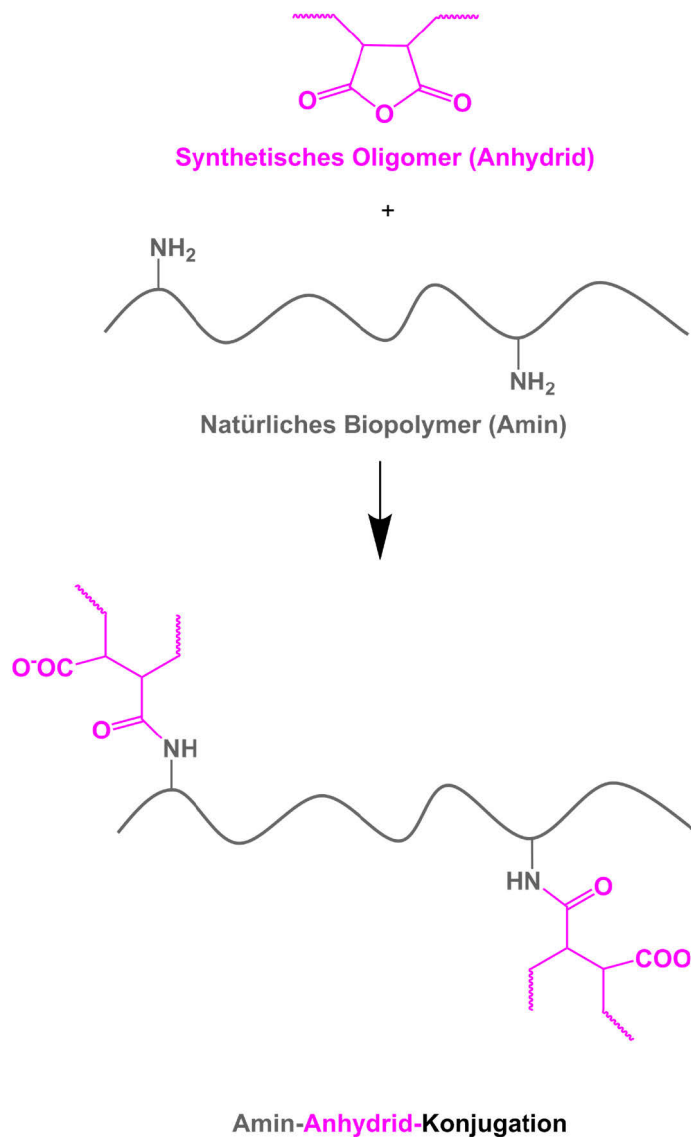


Abbildung 7: Amin-Anhydrid-Konjugation des Synthetischen Oligomers (pink) und des Bioaktiven Makromoleküls (grau).

Überschüssige Anhydride werden in wässriger Umgebung hydrolysiert, wodurch keine weitere Quervernetzung stattfinden kann. Neben den Komponenten mit Anhydriden und Aminen ist zusätzlich eine Base enthalten, um die Protonen der gleichzeitig freigesetzten Carboxyl-Funktionalitäten abzufangen und die Protonierung der verbleibenden Amine zu verhindern [20, 21]. Das bioaktive Makromolekül bzw. natürliche Biopolymer, in diesem Fall Chitosan oder Gelatine, fördert dabei die Zell-Material-Interaktionen und verleiht dem Hydrogel die spezifische Abbaubarkeit, um die Lebensfähigkeit der Zellen zu erhalten und die Proliferation und Matrixumbau zu fördern. Das synthetische Polymer hat den Vorteil der hohen Reinheit, der exzellenten Reproduzierbarkeit und der Kontrolle der chemischen Struktur. Die daraus enthaltenen Zweikomponenten-Hydrogele sollen sich in ihren mechanischen Eigenschaften gut variieren und modifizieren lassen, zellkompatibel sein und gute Interaktion mit den Zellen zeigen [21].

1.5 Bioprinting

Das Bioprinting stellt in den letzten Jahren eine neue Methode der Biofabrikation dar, die durch den automatisierten Ablagerungsprozess, mit hoher Reproduzierbarkeit, eine verbesserte Kontrolle über die Architektur der hergestellten Gewebe-Konstrukte bietet. Die herkömmlichen Biofabrikations-Methoden, wie zum Beispiel die Gefriertrocknung oder das Elektrosponnen wurden dadurch abgelöst. Durch das Bioprinting können Gewebe-Konstrukte, aus Biomaterialien und lebenden Zellen (zusammen „Biotinte“ genannt), mit vorprogrammierten Strukturen und Geometrien hergestellt werden [22]. Dafür werden computergestützte Transferprozesse für die Strukturierung und den Zusammenbau der Materialien verwendet [23]. Das Bioprinting lässt sich, wie Abbildung 8 zeigt, in drei Klassen einteilen: Das Tintenstrahl-Bioprinting (a), das Extrusion-basierte Bioprinting (b) und das lasergestützte Bioprinting (LaBP) (c) [22]. Neben diesen Methoden gibt es auch noch die Möglichkeit der speziell angepassten Bioprinting-Systeme mit verschiedenen anwendungsspezifischen Funktionen [22]. Das bisher am meisten verbreitete Technologie ist das Extrusion-basierte Bioprinting. Es benötigt Biotinten, die im niedrigviskosen Zustand durch eine Düse befördert werden und nach der Ablagerung durch zusätzliche Vernetzung stabil bleiben [24]. Für die vorliegende Arbeit wird später das

Extrusion-basierte Bioprinting mit einer Schnecken-Technologie von Bedeutung sein. Das Bioprinting an sich umfasst drei wichtige Schritte: Zuerst die Planungsphase mit der Erstellung des Druckdesigns als CAD-Datei (Computer-Aided-Design) und der Auswahl der Biotinte basierend auf der Druckfähigkeit der Biotinte und den Auswirkungen der Biotinte auf das Zellverhalten. Als Zweites den Druck mit der passenden ausgewählten Technologie und als Letztes den Prozess als finalen Schritt mit der Verarbeitung der gedruckten Hydrogel-Konstrukte. Dieser Schritt umfasst die Kultivierung und die Analyse der gedruckten Konstrukte [23].

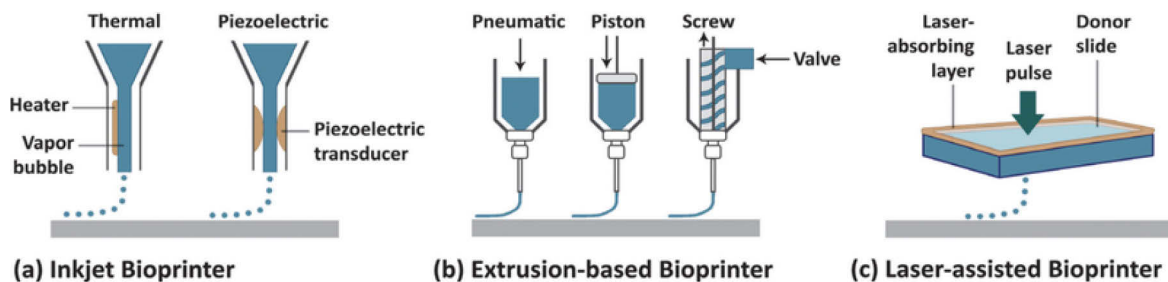


Abbildung 8: Schematische Darstellung der wichtigsten 3D-Bioprinting-Technologien [22].

1.5.1 Biotinte

Eine zentrale Herausforderung des Bioprintings stellt die Entwicklung des funktionalen Biotintenmaterials in Form einer Biotinte dar. Diese Entwicklung ist von entscheidender Bedeutung für den Erfolg des Bioprintings, vor allem dann, wenn die Zellen zusammen mit der Biotinte gedruckt und schließlich in die gedruckte Struktur eingekapselt werden sollen [25]. Das Hydrogel als Biotinte bildet das weiche Trägermaterial für die Zellen, die durch das Bioprinting-Verfahren in bestimmte räumlich definierte Strukturen gebracht werden. Durch das Bioprinting der Biotinte können komplexe biologische Konstrukte geschaffen werden, die biologische und biochemische Umgebungen nachstellen [26]. Bedingt durch die hohen Anforderungen an das zelluläre Bioprinting in Bezug auf Temperatur, pH-Wert, Druck, physikalische Kräfte und Osmolarität, um die Vitalität der gedruckten Zellen und die Bioaktivität der gedruckten Struktur zu sicherstellen, wurde bisher noch keine allgemein akzeptierte Biotinte für das zelluläre Bioprinting gefunden [25]. Hydrogele können dennoch in der Lage sein diese hohen Anforderungen zu erfüllen und werden aus diesem Grund für fast alle Biotinten-Formulierungen verwendet [27]. Um die richtige Biotinte zu finden, müssen bei der Auswahl des Hydrogels viele Parameter beachtet werden.

In dieser Arbeit besteht die Biotinte aus den Zellen, die in dem Hydrogel eingebettet werden sollen, dem bioaktiven Makromolekül und dem synthetischen Oligomer (Abbildung 9). Bei der Auswahl dieser Biotinte können viele der folgenden Parameter berücksichtigt und optimiert werden. Zunächst sollte die Biotinte aus einem weitmaschigen Netzwerk von hydrophilen Polymeren bestehen, die ein Vielfaches ihres Trockengewichts an Wasser aufnehmen können. In der Regel sollte der Wassergehalt zwischen 70 % und über 99 % liegen [27]. Wie im weiteren Verlauf dieser Arbeit noch gezeigt wird, weist die vorliegende Biotinte einen Wassergehalt von über 95 % auf und erfüllt damit die Anforderung an einen hohen Wassergehalt. Dieser macht die Hydrogele sehr porös und damit durchlässig für die Diffusion von beispielsweise Sauerstoff und Nährstoffen durch das Gerüst. Viele Hydrogele sind ebenfalls so konzipiert, dass sie porös genug sind, um die Zellmigration zu ermöglichen. Zudem sind einige dieser Hydrogele zusätzlich abbaubar, was bedeutet, dass sie anfänglich die nötige strukturelle Unterstützung für die Zellen bieten und sich dann abbauen, während die Zellpopulationen wachsen und ihre Umgebung umgestalten. Dies unterstützt die Bildung stabiler und funktionaler Gewebestrukturen, indem den Zellen Raum und die Möglichkeit gegeben wird, ihre eigene extrazelluläre Matrix zu bilden [27]. Wie Kapitel 4.9.2.3 mit Abbildung 150 dargestellt, trifft der Abbau des Hydrogels und damit die Bildung von Gewebestrukturen auch für diese Biotinte zu. Um den Biotinten eine gewisse mechanische Festigkeit geben zu können, muss es zudem zu einer Quervernetzung der Polymere kommen. Die Festigkeit kann dabei beispielsweise durch die Erhöhung des Polymer-Gehaltes oder durch die Vernetzungsdichte, unter Berücksichtigung der erforderlichen Permeabilität und Porosität, gesteigert werden [27]. Ein Parameter für die Festigkeit bzw. Druckbarkeit der Biotinte ist die Viskosität des Hydrogels. Ist die Viskosität zu hoch, kann eine Schädigung der Zellen durch hohe mechanische Kräfte und Scherspannungen die Folge sein, ist die Viskosität zu niedrig, kann die oben genannte Struktur des Hydrogels eventuell nicht gewährleistet werden. Der Innendurchmesser der Dosierkanüle beeinflusst ebenfalls die Lebensfähigkeit der Zellen nach dem Druckvorgang. Eine Kanüle mit größerem Durchmesser benötigt einen geringeren Druck, was zu niedrigeren Scherspannungen und damit zu einer höheren Zelllebensfähigkeit führt. Im Gegensatz dazu erzeugt eine Kanüle mit kleinerem Durchmesser höhere

Scherspannungen, was die Lebensfähigkeit der Zellen beeinträchtigen könnte [28]. Mit dem hier vorhandenen Hydrogel als Biotinte, konnte eine gute Festigkeit des Hydrogels in rheologischen Versuchen und gute physikochemische Eigenschaften gezeigt werden. Das Hydrogel zeigte zudem ausreichende Stabilität und eine Festigkeit, die die Zellkompatibilität der eingebetteten Zellen nicht beeinträchtigte. Der Einfluss des Kanüldurchmessers konnte ebenfalls untersucht werden. Dieser Kompromiss zwischen Biokompatibilität und Druckbarkeit, der erforderlich ist, um optimale Biotinten herzustellen, wird oft als "Biofabrikationsfenster" bezeichnet. Es bildet den zentralen Fokus bei der Optimierung und Verbesserung von Biotinten [27]. Vergleicht man die zuvor erwähnten Herausforderungen bei der Nutzung von Hydrogelen als Biotinten mit den Eigenschaften des in dieser Arbeit verwendeten Hydrogels, so zeigt sich, dass viele Parameter verbessert, werden konnten.

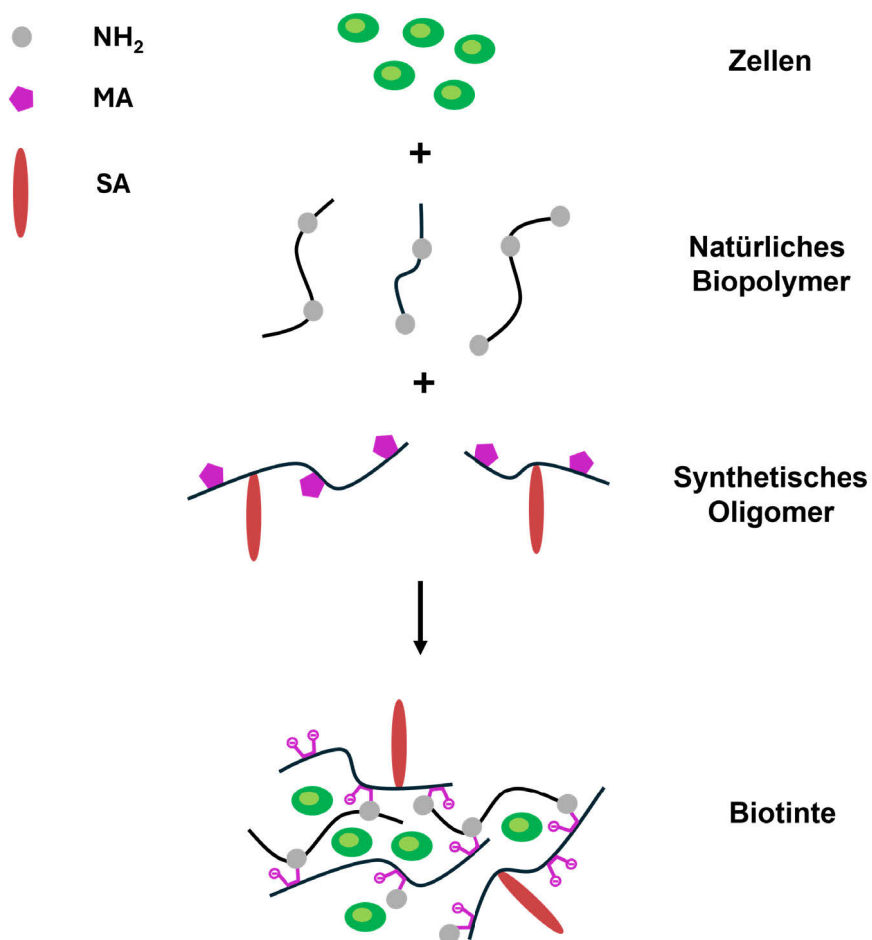


Abbildung 9: Veranschaulichung der Biotinte für diese Arbeit in Anlehnung an [29] und [30].

1.5.2 Zweikomponentendruck

Die meist schwachen mechanischen Eigenschaften der Biotinten in Bezug auf die Druckbarkeit und resultierende Stabilität der gedruckten Hydrogel-Konstrukte werden in der aktuellen Forschung versucht mit erhöhter Viskosität der Biotinte auszugleichen, was die Zellviabilität stark beeinträchtigen kann. Durch die erhöhte Viskosität wird ein höherer Druck für die Extrusion benötigt, was zu einer erhöhten Scherspannung führt. Diese erhöhte Scherspannung wirkt sich dann negativ auf die Anzahl an lebenden Zellen aus [31]. Neue Forschungsansätze beschäftigen sich mit der Entwicklung von dualen Systemen, in denen eine Zweikomponenten-Tinte verwendet wird, die das Überleben der Zellen in einem Teil der Tinte ermöglicht. Dieser Ansatz ermöglicht die Verwendung von zwei Komponenten mit niedriger Viskosität, die beim Zusammentreffen zu einer in-situ-Gelierung führen. Die Arbeit von Puertas-Bartolomé *et al.* [32] nutzte dabei einen statischen Mischer (Abbildung 10), der zwei Kartuschen in einem 3D-Drucker miteinander verbunden hat und eine Biotinte aus Carboxymethylchitosan (CMCh) und Natriumhyaluronat (HA) verwendete. Aufgrund seiner guten Löslichkeit bei physiologischem pH-Wert, was eine gute Einkapselung der Zellen in der Biotinte ermöglicht, wurde Carboxymethylchitosan (CMCh) in der Arbeit von Puertas-Bartolomé *et al.* [29] als eine Komponente ausgewählt. Die andere Komponente stellte das Natriumhyaluronat (HA) dar. Es ist unter anderem ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix (EZM) und fördert die Anheftung und Proliferation von Zellen. Natriumhyaluronat (HA) wäre allein nicht für den 3D-Druck geeignet, kann aber die Druckbarkeit der Biotinte aufgrund des scherverdünnenden Verhaltens verbessern. Die Quervernetzung erfolgte dabei durch die Bildung einer Schiff'schen Base über die freien Amine des Carboxymethylchitosans (CMCh) und den Aldehydgruppen des teiloxydierten Natriumhyaluronats (HA). In dieser Arbeit soll eine andere Technik verwendet werden, um eine Zweikomponenten-Tinte zu drucken. Dafür werden zwei identische Druckköpfe in einen 3D-Drucker eingebaut, die sich unabhängig voneinander in der Extrusionsgeschwindigkeit steuern lassen und so von zwei Motoren betrieben werden. Diese beiden Druckköpfe werden über einen speziell entwickelten Adapter miteinander verbunden (siehe Kapitel 2). Im Vergleich zu der Arbeit von Puertas-Bartolomé *et al.* [32] stellt die Nutzung von zwei Motoren einen

großen Vorteil dar. Um einen ausreichenden Vernetzungsgrad des gedruckten Hydrogels zu erreichen, ist die Abstimmung zwischen der Vernetzungskinetik des Hydrogels und der Extrusionsgeschwindigkeit von Bedeutung. Im Fall der Arbeit von Puertas-Bartolomé *et al.* [32] lässt sich die Extrusionsgeschwindigkeit nur über einen einzigen Motor steuern, der beide Spritzkolben miteinander verbindet und gleichzeitig mechanisch bewegt, sodass immer ein Volumenverhältnis von 1:1 der beiden Lösungen verwendet wird. Die resultierenden Konzentrationen der beiden Komponenten im Hydrogel können somit nur über die Ausgangskonzentrationen der Lösungen gesteuert werden. Im Fall dieser Arbeit kann die Extrusionsgeschwindigkeit während des 3D-Druckes so angepasst werden, dass andere Verhältnisse der Komponenten daraus resultieren, was Optimierungen in der Zusammensetzung des Hydrogels erleichtert. Zudem müssen im Fall von Puertas-Bartolomé *et al.* [32] auch beide Komponenten zuvor modifiziert werden. Das Chitosan muss zu Carboxymethylchitosan (CMCh) modifiziert werden und die Hyaluronsäure muss oxidiert werden, um reaktive Aldehyd-Funktionen für die Schiff'sche Basenverknüpfung zu erhalten [33]. In der vorliegenden Arbeit können alle verwendeten natürlichen Biopolymere so verwendet werden, wie sie vorliegen. Es ist zudem nach der Quervernetzungsreaktion über die Amin-Anhydrid-Konjugation nicht notwendig einen Stabilisierungsschritt, wie beispielsweise das Eintauchen in eine passende Lösung, miteinzubauen. Somit stellt diese Arbeit einen neuen Ansatz zur Weiterentwicklung der bisher bekannten Methoden bzw. Techniken zum Zweikomponentendruck dar.

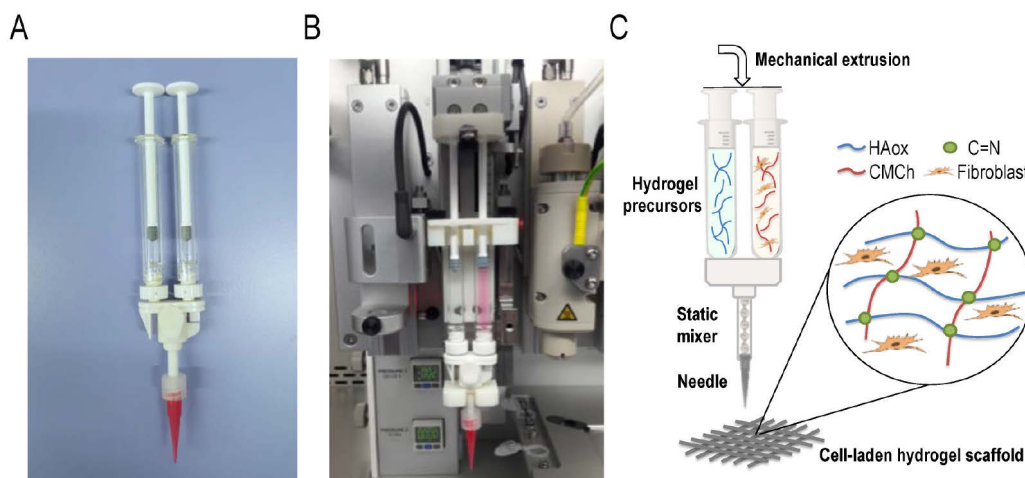


Abbildung 10: Statisches Mischwerkzeug mit a) zwei Kartuschen verbunden über den statischen Mischer, b) eingebaut in den 3D-Drucker und c) Schemazeichnung des Druckprozesses [32].

1.6 Natürlichen Biopolymere

Einige natürliche Biopolymere eignen sich aufgrund ihrer hervorragenden Biokompatibilität, biologischen Abbaubarkeit, guter Zellbindung und Stimulierung von Wachstumsfaktoren besonders als Scaffold für das Bioprinting [34]. Die künstliche Mikroumgebung kann damit die extrazelluläre Matrix optimal nachahmen. Natürliche Biopolymere für die Nutzung im Tissue Engineering können in zwei große Gruppen eingeteilt werden: Einmal die Biopolymere ohne Säugetier-Herkunft, wie die Meeresalgen (Carrageen, Agarose, Alginat), Krustentiere (Chitosan/Chitin), Insekten (Seidenfibrin), Pflanzen (Stärke) und Mikroorganismen (Xanthangummi, Gellangummi, Dextran) und zum anderen die auf Säugetierbasis wie Proteine (Kollagen, Fibrin, Elastin) und Glykosaminoglykane (Chondroitinsulfat, Hyaluronan und Heparin) [14]. In dieser Arbeit werden die Gelatine, ein durch Hydrolyse erhaltenes Derivat des Kollagens, und das Chitosan betrachtet. Dafür spielen für die Vernetzung über die Amin-Anhydrid-Konjugation die Amine der natürlichen Biopolymere eine Rolle. Die Amin-Anhydrid-Konjugation gehört dabei, aufgrund der Quervernetzungsreaktion der Amine und Anhydride, zu der Gruppe der chemischen Quervernetzung, wie Kapitel 1.4 und Abbildung 4 auch verdeutlichen.

1.6.1 Gelatine

Bei der Gelatine handelt es sich um eine hydrolysierte Form von Kollagen mit einem Molekulargewicht von 15-250 kDa [35], die hauptsächlich aus Bindegewebe von Rindern oder Schweinen gewonnen wird [32]. Daneben kommen noch andere natürliche Quellen wie Fischhäute, -knochen und -flossen sowie Seeigel und Quallen vor [36]. Die Gelatine behält dabei einige Signalsequenzen des Kollagens, wie zum Beispiel die Arg-Gly-Asp (RGD)-Sequenz, bei und fördert aus diesem Grund ebenfalls die Zelladhäsion, die Zelldifferenzierung und das Zellwachstum, was zu einer erhöhten Biokompatibilität beiträgt [37, 38]. Durch die enthaltenen Aminosäuren Prolin, Glycin und Hydroxyprolin ähnelt sie dem Kollagen auch in der Struktur (Abbildung 11) und kann die EZM gut nachahmen [39]. Zudem wird sie aufgrund der geringen mechanischen Festigkeit selten allein als Scaffold genutzt und aus diesem Grund in dieser Arbeit mit einem synthetischen Oligomer vernetzt. Gelatine wird in Typ A und Typ B eingeteilt, wobei Typ A aus der sauren und Typ B

aus der neutralen Denaturierung und Hydrolyse gewonnen wird. Die Unterschiede ergeben sich bei den isoelektrischen Punkten für Typ A bei 7-9 und Typ B bei etwa 5. Ein Vorteil für die Nutzung als Biomaterial bzw. Scaffold ist die Temperaturabhängige Gelierfähigkeit der Gelatine. Bei Temperaturen über 40 °C ist die Gelatine in Wasser löslich, wobei sie bei Temperaturen unter 30 °C eine Dreifach-Helix-Struktur und Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet, was zu der Bildung eines Hydrogels führt [37].

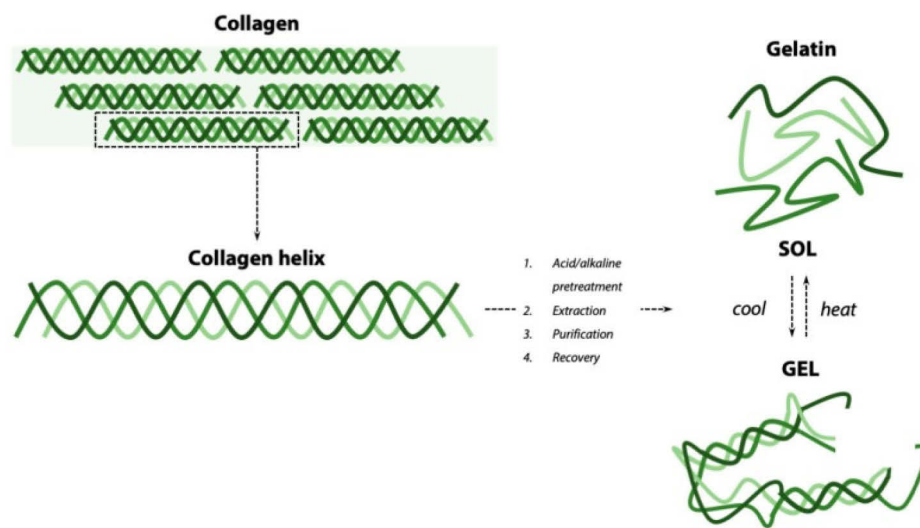


Abbildung 11: Das unlösliche Kollagen mit der Triple-Helix-Struktur, wird entweder durch saure (Gelatine A) oder alkalische (Gelatine B) Vorbehandlung verarbeitet. Bei der aus der Hydrolyse gewonnenen Gelatine (in Wasser gelöst), kann durch Temperaturunterschiede ein Sol-Gel-Übergang stattfinden (rechts) [40].

1.6.2 Imagel®

Bei Imagel® handelt es sich um hochgereinigte Kollagen-Peptide aus der Rinderhaut, die durch partielle Hydrolyse der Gelatine erhalten wurden. Sie haben ein mittleres Molekulargewicht von 10000 bis 14000 g/mol und zeigen keinen temperaturabhängigen Sol-Gel-Übergang. Für eine Hydrogel-Herstellung wird die chemische Quervernetzung benötigt. Der aktuelle Name des Produktes der Firma Gelita AG lautet „Peptiplus® XB-UHV“ [20, 41].

1.6.3 Chitosan

Chitosan ist ein lineares Polysaccharid, das aus β -1,4-verknüpften 2-Amino-2-Desoxy-D-glucose (GlcNH₂) -Resten und zufällig angeordneten N-Acetylglucosamin (GlcNAc)-Gruppen besteht. Es wird, wie Abbildung 12 zeigt, durch Deacetylierung aus Chitin erzeugt und hat ein mittleres Molekulargewicht von 50-1000 kDa [38]. Am häufigsten findet man Chitin in Krebstieren (bis zu

30 %), aber auch in einigen Algen und Pilzen [42]. Chitosan ist in saurer Lösung löslich, da dort die deacetylierten anhängenden Aminogruppen protoniert werden und Chitosan somit zu einem Polykation wird. Kommerzielle Produkte des Chitosans haben Deacetylierungsgrade zwischen 50 und 90 % [38].

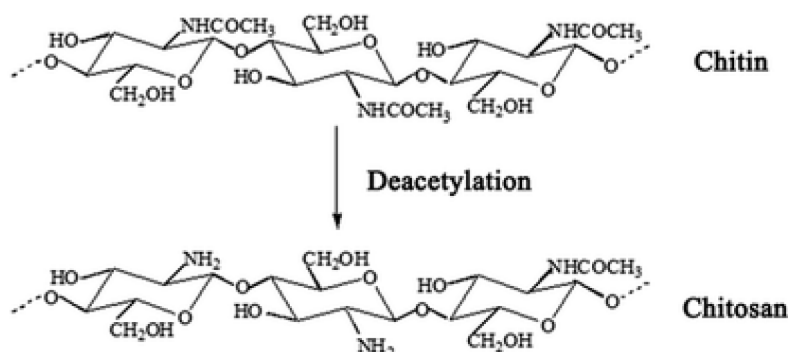


Abbildung 12: Chemischen Strukturen von Chitin und Chitosan [43].

Die strukturellen Eigenschaften des Chitosans, sind denen der EZM sehr ähnlich, sodass es für das Zellwachstum während der Gewebeneubildung gut geeignet ist. Es zeigt eine gute Biokompatibilität, biologische Abbaubarkeit, antimikrobielle Kapazität und Mukoadhäsivität [42]. Zudem ist es nicht-toxisch, stabil und kann sterilisiert werden [44].

1.7 Synthetisiertes Oligomer

Um die Amin-Anhydrid-Konjugation als Quervernetzungsreaktion für die Herstellung von Hydrogelen verwenden zu können, wurden Oligomere, die Anhydride enthalten, als Basis für die Biotinte synthetisiert. In der Arbeitsgruppe gab es bisher eine Reihe von Oligomeren, die für die Quervernetzung der natürlichen Biopolymere verwendet wurden. Die erste Generation befasste sich mit einer Reihe von Makromeren auf Poly(*N*-isopropylacrylamid) basierend, die eine thermisch induzierte Gelierung zeigten und an denen erste Quervernetzungsreaktionen getestet wurden. In diesem Fall wurde das Makromer durch radikalische Polymerisation aus *N*-Isopropylacrylamid (NiPAAm), Pentaerythritdiacrylat-Monostearat (PEDAS), einem bifunktionellen Monomer mit einer langen hydrophoben Kette, Acrylamid, einem hydrophilen Monomer, und Hydroxyethylacrylat, einem hydrophilen Monomer, das zur Bereitstellung von Hydroxylgruppen für die weitere chemische Modifizierung verwendet wurde, synthetisiert. Das Gleichgewicht der verschiedenen Monomere zueinander

beeinflusste dabei die Übergangstemperatur vom Sol in den Gel-Zustand [45]. In der nächsten Generation wurden zum ersten Mal Anhydrid-haltige Oligomere (oPNMA) synthetisiert, die Maleinsäureanhydrid (MA), *N*-Isopropylacrylamid (NiPAAm) und Pentaerythritoldiacrylat-Monostearat (PEDAS) enthielten. Das PEDAS als bifunktionelles Monomer mit lipophiler Stearat-Kette sorgte wie oben für eine erhöhte Hydrogel-Stabilität, das NiPAAm für eine gute Temperaturempfindlichkeit und das MA für die erwünschte Reaktivität mit zum Beispiel natürlichen Biopolymeren. Dabei war es möglich Oligomere mit verschiedenen MA-Gehalten zu synthetisieren, um Oligomere mit unterschiedlichen Vernetzungseigenschaften zu erhalten [46]. Die Anhydrid-haltigen Oligomere wurden über die Zeit weiterentwickelt. So tauschten Kascholke *et al.* das NiPAAm gegen Diacetonacrylamid (*N*-(1,1-Dimethyl-3-oxobutyl)acrylamid) als anderes Monomer aus und testeten die Quervernetzungsreaktion mit gelatinösen Peptiden, was zu einer erhöhten Hydrogel-Festigkeit führte [47]. Um Biomaterialien zu entwerfen, die verbesserte Nervenleitschienen, nachstellen können, blieben Kohn *et al.* bei den oPNMA-Oligomeren und Gelatine bzw. gelatineartigen Peptiden als Biopolymer [48]. In all den genannten bisherigen Generationen war es aber nur möglich die vorgefabrizierten Hydrogele auf Zellkompatibilität zu testen und nicht die Zellen in das Hydrogel einbetten zu können. Aus diesem Grund wurden in der nächsten Generation an Oligomeren viele Veränderungen in den benötigten Lösungsmitteln und Basen, die als Protonenfänger benötigt werden, vorgenommen und die Zytotoxizität von Lösungsmitteln, die in direkten Kontakt zu den Zellen kommen, zum ersten Mal bestimmt. Um eine Reihe an verschiedenen Oligomeren für die Quervernetzung mit Gelatine zu haben und die Zytotoxizität der Oligomere zu verringern, wurden neben PEDAS und MA insbesondere hydrophilere Monomere ausprobiert, wie 4-Acryloylmorpholin (AMo), *N*-Vinyl-Pyrrolidon (NVP) und 2-Hydroxypropylacrylat (HPA). In ersten Versuchen wurden die Zellen hier in die wässrige Gelatine-Lösung eingebettet [21]. Daran anschließende Arbeiten beschäftigten sich mit der Verwendung von Chitosan-Lösungen anstelle von Gelatine-Lösungen und der möglichen Einbettung von Zellen [29] und dem ersten Versuch des 3D-Druckes aus einer Kartusche ohne lebende Zellen [20]. Die aktuelle Generation an Anhydrid-haltigen Oligomeren mit dem Hinblick auf eine direkte Einbettung von

Zellen und dem 3D-Druck des Hydrogels als Biofabrikationsprozess, wurde in dieser Arbeit entwickelt. Dafür wurde der lipophile Baustein PEDAS gegen Stearylacrylat (SA) ausgetauscht, wie Abbildung 13 zeigt.

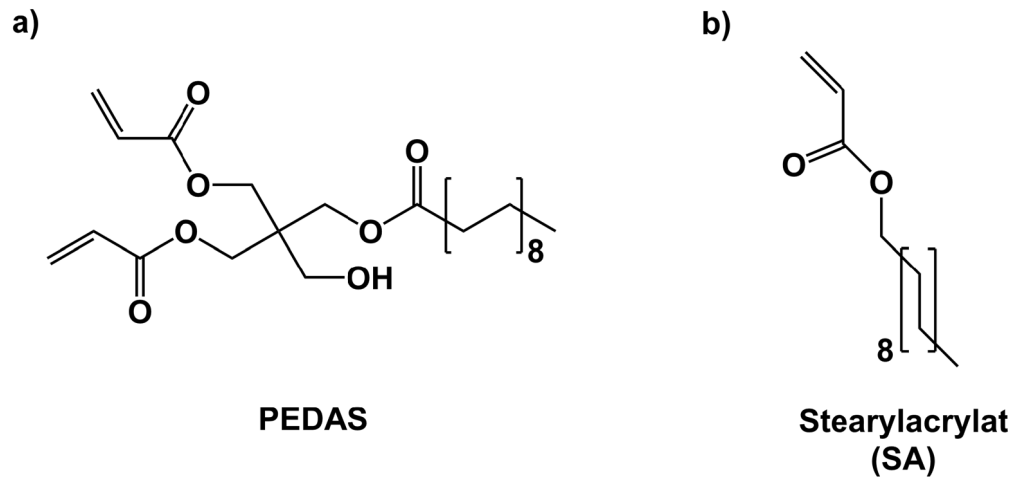


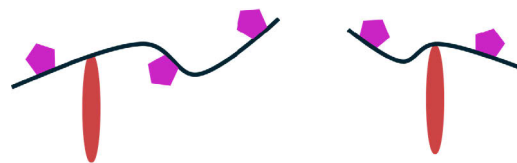
Abbildung 13: Struktur der hydrophoben Monomere mit a) PEDAS und b) SA.

Zudem wurde sich auf die Verwendung von AMo als hydrophiles Comonomer fokussiert, um die Zytotoxizität des Oligomers zu verringern. Mit dieser Art an Oligomer, welches den Namen oSMoMA-x trägt, wurden dann Gelierungsversuche mit Gelatine und Chitosan durchgeführt, um eine direkte Einbettung der Zellen zu ermöglichen und so eine Biotinte entwerfen zu können, die mit dem 3D-Drucker gedruckt werden konnte.

2 Ziele der Arbeit

Die Ziele dieser Arbeit beziehen sich auf die zuvor beschriebene Einleitung und lassen sich so zusammenfassen:

- 1) Die Synthese einer Reihe von neu entwickelten Anhydrid-haltigen Oligomeren „oSMoMA-x“ mit unterschiedlicher Zusammensetzung der Comonomere, um die spätere Einstellung der mechanischen Eigenschaften der Hydrogele zu ermöglichen. Für die erforderliche Reaktivität gegenüber Nukleophilen, in diesem Fall mit den Aminen der natürlichen Biopolymere [21], sollte analog zu den vorangegangenen Arbeiten ebenfalls das Maleinsäureanhydrid (MA) sorgen. Als lipophiler Baustein, der die mechanischen Eigenschaften des Oligomers verbessern soll [29], sollte das zuvor in der Arbeitsgruppe verwendete zweiarmige PEDAS in der Synthese gegen das einarmige Stearylacrylat (SA) ausgetauscht werden (Abbildung 13). Mit Hinblick auf die spätere Verwendung des Hydrogels als Biotinte, wurde ein als drittes Monomer, mit dem Acryloylmorpholin (AMo), ein deutlich Hydrophileres gewählt als zuvor. Die Gesamtkomposition von oSMoMA-x sollte eine Oligomer-Variante darstellen, die durch erhöhte Hydrophilie eine verminderte Zytotoxizität auf die Zellviabilität zeigt. Nach erfolgreicher Synthese sollte die Zusammensetzung der Oligomere mittels verschiedener Charakterisierungsmethoden untersucht und aufgeklärt werden. Das Ziel war die Etablierung einer Reihe von Oligomeren mit unterschiedlichen MA-Gehalten im Bereich von 2 bis 10.



**Synthetisches
Oligomer**

Abbildung 14: Schemazeichnung eines synthetischen Oligomers.

- 2) Die anschließende Fabrizierung von Hydrogelen über die Amin-Anhydrid-Konjugation von den neu synthetisierten Anhydrid-haltigen Oligomeren und den drei verschiedenen natürlichen Biopolymeren zum Vergleich. Dabei sollte, unter der Herausarbeitung der unterschiedlichen Eigenschaften der Hydrogele, gezeigt werden, dass oSMoMA-x als vernetzende Komponente in der Lage ist Hydrogele mit Gelatine, Imagel® und Chitosan zu bilden. Alle Varianten der Hydrogele sollten zudem für die bessere Durchmischung mit der elektronischen Pipette hergestellt werden. Das Ziel in diesem Teil bestand zudem darin die Zytotoxizität des Hydrogels durch die Veränderung in der Zusammensetzung zu reduzieren. Zu diesem Zweck sollte die Möglichkeit geprüft werden, einerseits den Anteil des organischen Lösungsmittels, die Konzentration des Oligomers und die Konzentration der Base zu reduzieren. Andererseits sollten bereits erste Nährmedien, wie DMEM, anstelle von reinem Wasser in das Hydrogel eingebracht werden. Für jedes Hydrogel mit anderem natürlichen Biopolymer sollte so die optimale Zusammensetzung in Bezug auf die Stabilität und mögliche Zytotoxizität gefunden werden. Dafür wurden zuvor veröffentlichte Methoden der jeweiligen Hydrogel-Herstellung adaptiert und in ihrer Zusammensetzung weiterentwickelt.

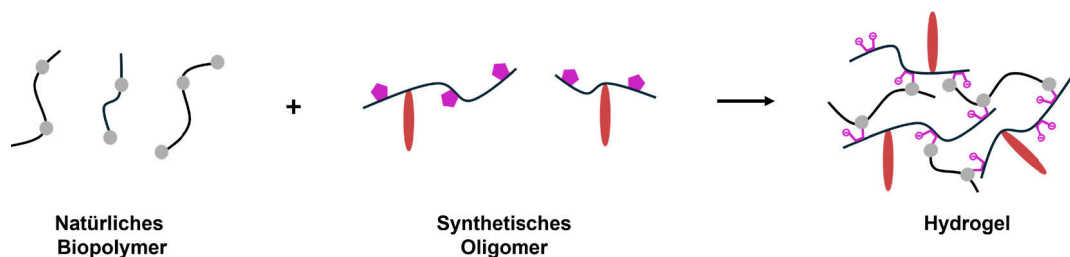


Abbildung 15: Schemazeichnung der Herstellung des Hydrogels aus natürlichem Biopolymer und synthetischem Oligomer.

- 3) Aufgrund der zuvor bestimmten Eigenschaften der Hydrogele sollte eines ausgewählt werden, welches zu einem Biomaterial bzw. einer Biotinte, die als Scaffold für den 3D-Druck dienen konnte, entwickelt werden. Dafür sollten verschiedene Zusammensetzungen unter anderem zuerst auf Stabilität/Festigkeit und anschließend auf Biokompatibilität getestet werden. Die Einbettung der Zellen in das Hydrogel sollte während der Herstellung erfolgen und einen direkten 3D-Druck daraus ermöglichen. Durch die vorherige Auswahl eines geeigneten Assays sollte die Zellviabilität über mehrere Tage bestimmt werden. Eine Erhöhung der Zellviabilität sollte zeigen, dass die Zellen im Hydrogel proliferieren und differenzieren.

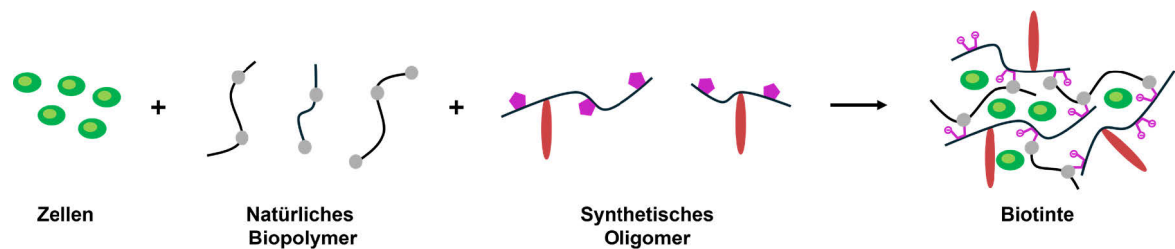


Abbildung 16: Schemazeichnung der Entwicklung der Herstellung einer Biotinte aus den Zellen, dem natürlichen Biopolymer und dem synthetischen Oligomer.

- 4) Für den 3D-Druck des entwickelten Hydrogels als Biotinte, musste der herkömmliche 3D-Drucker, der für den Druck von Filamenten ausgelegt ist, durch verschiedene Anpassungen umgebaut und ein neuer Druckkopf verbaut werden. In Vorversuchen sollte dabei zuerst gezeigt werden, dass die Druckeinstellungen so angepasst werden können, dass ein Hydrogel als halbfestes System aus einer Kartusche gedruckt werden könnte. Nach der erfolgreichen Durchführung der Vorversuche, sollte dann die Möglichkeit des Druckes der ausgewählten Biotinte aus einer Kartusche gezeigt werden. Das Ziel war hier die Zellviabilität der gedruckten Hydrogel-Konstrukte über mehrere Tage mit einem Zellviabilitätsassay zu überprüfen. Dabei sollte die Zellviabilität idealerweise von Tag 1 bis Tag 7 hin steigen, was die Proliferation der Zellen in dem gedruckten Hydrogel zeigen würde.

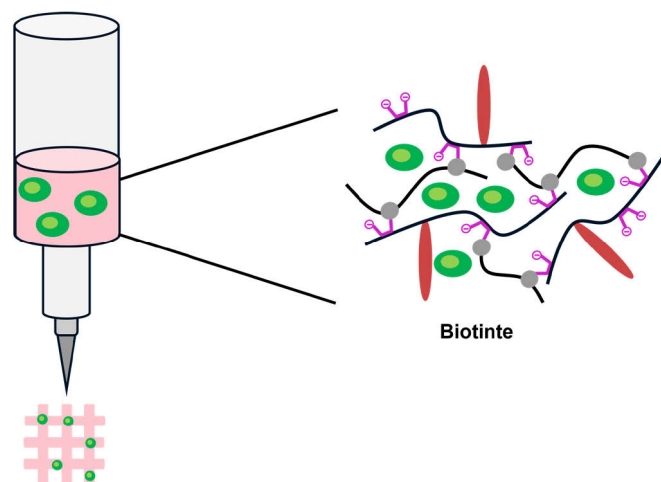


Abbildung 17: Schemazeichnung des 3D-Druckes aus einer Kartusche mit dem Hydrogel als Biotinte.

- 5) Das finale Ziel dieser Arbeit sollte der Zweikomponentendruck der Biotinte aus zwei miteinander verbundenen Druckköpfen in dem zuvor umgebauten 3D-Drucker sein. Die Herausforderungen des Zweikomponentendruckes, wie eine unzureichende Stabilität des Hydrogels durch mangelnde Quervernetzung bzw. mangelnde Vermischung der Komponenten oder die unzureichende Homogenität des Hydrogels nach dem Druckvorgang, sollten dabei berücksichtigt werden. Durch die geringere Viskosität der einzelnen Komponenten vor der Quervernetzungsreaktion sollte der ausgeübte Stress auf die Zellen während des Druckvorganges reduziert werden. Um den Zweikomponentendruck an dem vorhandenen 3D-Drucker zu realisieren, sollten eine Halterung für die zwei Druckköpfe und ein Verbindungsstück für die beiden Druckköpfe entwickelt und hergestellt werden. Anschließend sollte gezeigt werden, dass die Herstellung des Hydrogels auch während des 3D-Druckens durch die Verbindung der beiden Druckköpfe möglich ist und zu homogenen Hydrogelen führt.

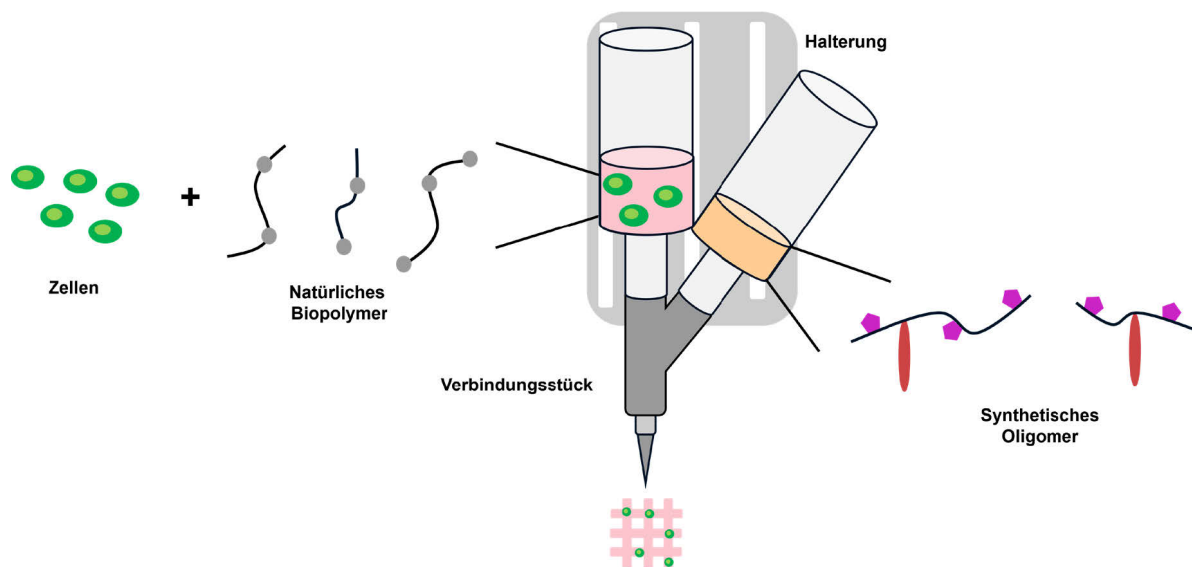


Abbildung 18: Schemazeichnung Zweikomponentendruck des Hydrogels. In der linken Kartusche befinden sich die Zellen und das natürliche Biopolymer. In der rechten Kartusche das Oligomer in Lösung.

3 Experimenteller Teil

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Aceton ($\geq 99,5\%$), 4-Acryloylmorpholin (Acryloylmorpholin, AMo), 2,2'-Azobis(2-Methylpropionitril) (Azobisisobutyronitril, AIBN), Chitosan (niedriges Molekulargewicht), Dichlormethan ($\geq 99,0\%$, mit Amylen als Stabilisator), Dimethylsulfoxid (wasserfrei, $\geq 99,9\%$, DMSO), Dimethylsulfoxid- d_6 ($99,9\%$, DMSO- d_6), Gelatine aus (Schweinehaut, Gelstärke 300, Typ A), β -Glycerophosphat, 1-Methyl-2-Pyrrolidinon (NMP), Minimum Essential Medium (MEM), *N,N*-Dimethylformamid ($\geq 99,8\%$, DMF), Octadecylacrylat (Stearylacrylat, SA), Picrilsulfonsäure-Lösung 5% (W/V) in H_2O (2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure-Lösung, TNBS), 1,2-Propanediol (Propylenglykol, PG), Salzsäure ($\geq 37\%$, HCl) und Triethanolamin ($\geq 99,0\%$, TEOA) wurden von Sigma-Aldrich[®] (Seelze, Deutschland) bezogen. Anilin ($99,5\%$), 3-Hydroxy-1-Methylpiperidin (NMPO), Maleinsäureanhydrid (99% , MA) wurden von Thermo Fisher Scientific/ Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland) angeboten. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fetales Kälberserum (FBS), Penicillin/ Streptomycin (PenStrep) und $0,05\%$ Trypsin-EDTA (1x) wurden von Gibco by Thermo Fisher Scientific/ Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland) und PrestoBlue[™] Zellviabilitätsreagenz von Invitrogen by Thermo Fisher Scientific/ Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Über die Fisher Scientific[™] (Schwerte, Deutschland) wurden Dichlormethan, Diethylether, Ethanol (96% V/V), Natriumhydroxid (NaOH) und Natriumhydroxid $0,1\text{ M}$ (NaOH) bezogen. Die Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) bot *N*-Butyl-2-Pyrrolidon (Solvagreen[®] $\geq 99,5\%$, NBP), Dihydrolevoglucosenon (Solvagreen[®] $\geq 98,5\%$), Trypanblaulösung $0,4\%$ zum Zählen der Zellen und WST-8-Zellviabilitätsreagenz (Rotitest[®] Vital) an. Benzoesäure für die Analyse, Kaliumhydrogenphthalat, Natriumbicarbonat ($NaHCO_3$), Tetrahydrofuran (THF), welches über Natrium und Kalium refluxiert und vor der Verwendung frisch destilliert wurde, und Tetrahydrofurfurylalkoholpolyethylenglycolether (Glycofurol) wurden über Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Das Rattenschwanz-Kollagen (Typ 1, $2,05\text{ mg/ml}$ in $0,6\%$ Essigsäure) war von First Link (UK) Ltd.

(Wolverhampton, Großbritannien), das α -MEM Eagle und die Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS) von PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland) und das Imager[®] von der Gelita AG (Eberbach, Deutschland). Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat und Salzsäure 0,1 M (HCl) wurden über VWR BDH Prolabo (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Demineralisiertes Reinstwasser, das für alle Experimente in dieser Arbeit verwendet wurde, wurde mit einem MicroPure Reinstwassersystem (Barnstead[™] MicroPure[™], Thermo Fisher Scientific/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) hergestellt.

3.1.2 Oligomer-Synthese

Einem bereits bekannten Protokoll folgend [45], wurde das Oligomer Oligo(SA-*ran*-AMo-*ran*-MA) (oSMoMA-x) durch eine freie radikalische Polymerisation aus Stearylacrylat (SA), Acryloylmorpholin (AMo) und Maleinsäureanhydrid (MA) synthetisiert (Abbildung 19). Das molare Verhältnis von SA zu den Comonomeren (MA + AMo) betrug in jeder Variation der Synthese 1:20. Das molare Verhältnis von MA zu SA, was an dem **x** im Namen erkenntlich ist, wurde zwischen 2 und 10 variiert, sodass es eine Reihe an oSMoMA-x mit verschiedenen molaren Verhältnissen gab (Tabelle 1).

Tabelle 1: Theoretische Anteile an Monomeren von oSMoMA-x nach der Synthese (radikalische Polymerisation).

oSMoMA-x	SA	MA	AMo
oSMoMA-2	1	2	18
oSMoMA-2,5	1	2,5	17,5
oSMoMA-3	1	3	17
oSMoMA-3,5	1	3,5	16,5
oSMoMA-4	1	4	16
oSMoMA-5	1	5	15
oSMoMA-6	1	6	14
oSMoMA-7,5	1	7,5	12,5
oSMoMA-10	1	10	10

In einem bestimmten Volumen an frisch destilliertem THF wurden die zuvor ausgerechneten und abgewogenen Mengen an Comonomeren gelöst. Dabei wurde MA gemeinsam mit SA und AMo getrennt von beiden mit einer Spritze in den Rundhalskolben (bereits mit THF gefüllt) überführt. Nachdem in dem Rundhalskolben eine Temperatur von 60 °C erreicht worden war, wurde die Reaktion unter inerter Stickstoff-Atmosphäre mit AIBN (2 % M/M) als Radikalstarter gestartet. Nach 18 Stunden Reaktionszeit wurde mit dem Rotationsverdampfungsverfahren (RC 600, KNF, Freiburg, Deutschland) überschüssiges THF entfernt und die synthetisierte Polymerlösung aufkonzentriert. Das Polymer wurde mehrfach in Diethylether präzipitiert, gewaschen und anschließend mittels Zentrifugation aufgefangen. Dieses Aufreinigungsverfahren wurde an 3 Tagen wiederholt, bevor das Polymer endgültig unter reduziertem Druck getrocknet werden konnte.

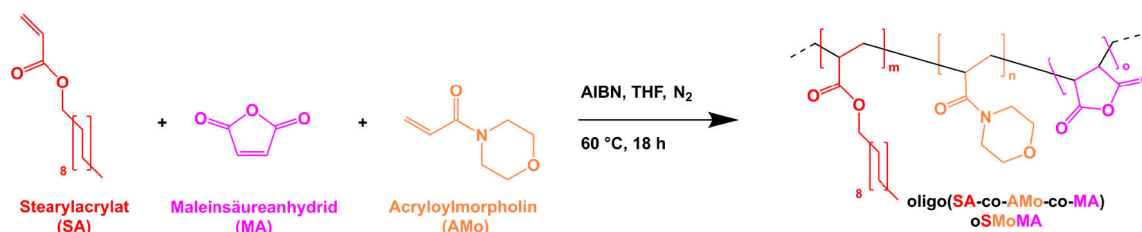


Abbildung 19: Reaktionsschema Synthese von *oSMoMA-x*.

3.2 Methoden

3.2.1 Datenanalyse und graphische Darstellung

Alle Berechnungen und statistische Auswertungen der Daten wurden mit Microsoft® Excel® für Microsoft 365 MSO (Version 2405 Build 16.0.17628.20006, Microsoft Corporation, USA) durchgeführt. Die statistischen Tests auf Signifikanz wurden mit Hilfe des zweiseitigen Welch-t-Tests durchgeführt. Die Daten wurde mit Origin® 2021b (OriginLab Corporation, USA) graphisch dargestellt. Alle chemischen Strukturen wurden mit Chemdraw® Professional (Version 23.0.1, Revvity Signals, Waltham, Massachusetts, USA) gezeichnet. Eigene schematische Darstellungen wurden in Microsoft® PowerPoint® für Microsoft 365 MSO (Version 2405 Build 16.0.17628.20006) erstellt.

3.2.2 Charakterisierung Oligomer

Nach einer Trocknungszeit von 14 Tagen unter reduziertem Druck, konnte das synthetisierte Oligomer mit verschiedenen analytischen Methoden charakterisiert werden.

3.2.2.1 NMR-Spektroskopie (¹H-NMR)

Um die chemische Zusammensetzung des Oligomers zu erfassen, wurde ein ¹H-NMR Spektrum (Bruker Avance III – 300, Bruker Corporation, Billerica, USA) bei 300 MHz aufgenommen. Dafür wurde das Oligomer mit einer Konzentration von 2,5 mg/ml in deuteriertem DMSO gelöst. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der MestReNova x64-14.2.0-26256 Software (MestReNova, Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spanien).

3.2.2.2 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die Gelpermeationschromatographie wurde genutzt, um die Verteilung des Molekulargewichtes mit dem SECurity GPC System (Agilent Technologies, Boeblingen, Deutschland) zu bestimmen. Dafür wurden die Proben vor der Analyse in frisch destilliertem THF (10 mg/ml) gelöst und anschließend filtriert (0,45 µm, PTFE-Membranfilter, VWR, Langenfeld, Deutschland). Die Analyse erfolgte relativ zu dem Polystyrol Standard Kit (ReadyCal Kit, PSS) auf einer analytischen Säulenkombination auf Polymerbasis (SDV-Kombinationsmedium, 5 µm Partikelgröße, PSS Polymer Standard Service GmbH, Mainz, Deutschland)

und wurde über die WinGPC Unity Software (PSS) kontrolliert. Für jedes Oligomer wurde so das zahlenmittlere Molekulargewicht (M_n), das gewichtsmittlere Molekulargewicht (M_w) und die Dispersität (D) erhalten.

3.2.2.3 Titration

Die folgenden bereits veröffentlichten Arten der Titration [46] wurden genutzt, um die Intaktheit (%) der Anhydride des Oligomers mit der folgenden Formel (Formel 1) zu bestimmen:

$$Anhydrid_{intakt} [\%] = \left[1 - \frac{([MA]_{BFT} - [MA]_{KT})}{[MA]_{KT}} \right] \times 100 \%$$

MA – Gehalt Maleinsäureanhydrid

KT – Konduktometrische Titration

BFT – Brown-Fujimori-Titration

Formel 1: Berechnung der Intaktheit der Anhydride nach der konduktometrischen und der Brown-Fujimori-Titration.

3.2.2.3.1 Konduktometrische Titration (KT)

Die Quantität an eingebauten MA-Bestandteilen konnte mit der konduktometrischen Titration bestimmt werden (Abbildung 20). Dazu wurde das Oligomer mit der Rückwiegetechnik abgewogen (LS 120A, Precisa, Dietikon, Schweiz) und in 50 ml Aceton gelöst. Nachdem Lösungsvorgang, wurden 50 ml demineralisiertem Wasser zu der Probe gegeben und für 2 Stunden bei 60 °C gerührt (MR Hei-Tec, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland), um alle vorhandenen Anhydride zu hydrolysieren. Die resultierende Lösung wurde gegen 0,1 M NaOH, welche zuvor mit Kaliumhydrogenphthalat eingestellt worden war, titriert. Um den Endpunkt zu bestimmen, wurde die Leitfähigkeit mit einem Konduktometer (EC-36 cond, Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland) gemessen. Alle Titrations wurden dreifach durchgeführt.

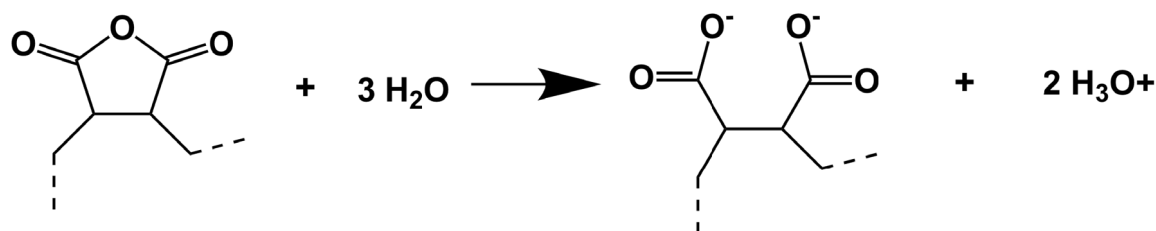


Abbildung 20: Reaktionsschema Konduktometrische Titration.

3.2.2.3.2 Brown-Fujimori-Titration (BFT)

Die prozentuale Intaktheit der eingebauten Anhydride im Oligomer konnte mit der Brown-Fujimori-Titration bestimmt werden (Abbildung 21).

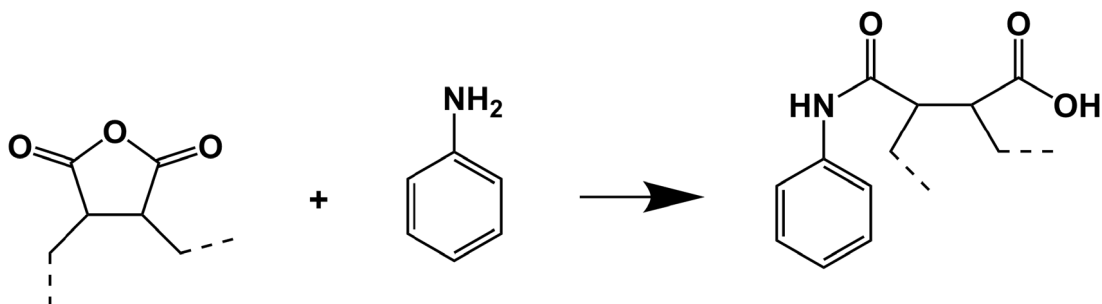


Abbildung 21: Reaktionsschema Amidierung der Anhydride von oSMoMA-x.

Das Oligomer wurde mit der Rückwiegetechnik abgewogen (LS 120A, Precisa, Dietikon, Schweiz) und in 10 ml frisch destilliertem THF gelöst. Anschließend wurden für die Amidierung der intakten Anhydride 5 ml Anilin zu der Probe gegeben. Nach 5 Minuten wurden 50 ml Ethanol (96 % V/V) ergänzt. Um den Endpunkt zu bestimmen, wurden die amidierten Anhydride des Oligomers gegen 0,05 M ethanolische NaOH, welche vorher mit Benzoesäure eingestellt worden war, titriert. Die Leitfähigkeit wurde mit einem Konduktometer (EC-36 cond, Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland) gemessen und alle Titrationen wurden dreifach durchgeführt.

3.2.3 Zusätzliche Aktivierung des Oligomers

Vor jeder Verwendung wurden die eventuell bereits durch Feuchtigkeit gespaltenen Anhydride des Oligomers oSMoMA-x für 24 Stunden im Trockenschrank (UT 6200, Hereaus, Hanau, Deutschland) bei 130 °C aktiviert (Abbildung 22).

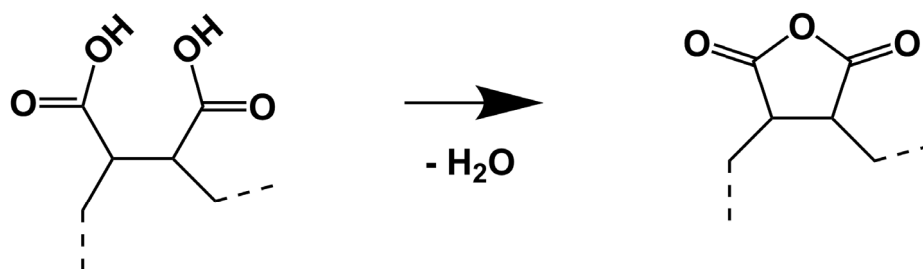


Abbildung 22: Reaktionsschema zusätzlichen Aktivierung der Anhydride von oSMoMA-x.

An oSMoMA-3 als Beispiel wurden Vergleiche eines zusätzlich aktivierten Oligomers und eines nicht-aktivierten Oligomers anhand des ^1H -NMR-Spektrums, der GPC, den Titrationen und der Gelierungskinetik durchgeführt.

3.2.4 Gelherstellung für die natürlichen Biopolymere

Für jedes der drei natürlichen Biopolymere gibt es eine eigene Herstellungsmethode, die weiterentwickelt worden ist, und bestimmte Verhältnisse der Komponenten zueinander enthält. Dabei wurde im Vergleich zu den anderen Methoden das erste Mal oSMoMA-x als Oligomer verwendet. Bei den Lösungen der Komponenten unterscheidet man zwischen dem natürlichem Biopolymer, einer Base und dem Oligomer als Quervernetzer. Für die Gelierungskinetik (3.2.5.1) und die Zellviabilitätsversuche (3.2.6) wurde die elektronische Pipette (siehe Kapitel 3.2.4.4) genutzt. Für alle anderen Versuche wurden einzelne Eppendorf-Pipetten und der Vortex-Mischer (Mixer KMC-1300 V, Vision Scientific, Yuseong-Gu, Daejeon-Si, Korea) zum Vermischen genutzt.

3.2.4.1 Gelherstellung Gelatine

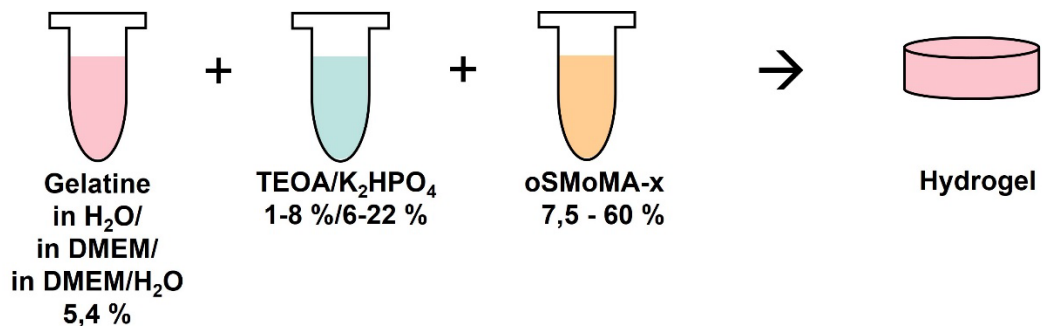


Abbildung 23: Allgemeine Darstellung zur Herstellung des Gelatine-Hydrogels.

Die Herstellungsmethode für das Gelatine-Hydrogel (Abbildung 23) stellt eine Weiterentwicklung einer bereits bekannten Methode dar. Dabei wurden im Laufe der Zeit viele Schritte unternommen, um das Hydrogel besser zellkompatibel zu machen (siehe Kapitel 3.2.8: Entwicklung der Biotinten). Die Gelatine (Typ A, Bloom-Wert 300) wurde in demineralisiertem Wasser, reinem DMEM oder in demineralisiertem Wasser (10,8 % oder 8,1 %), mit anschließendem Verdünnungsschritt (2:1 oder 1:1) mit DMEM so gelöst, dass eine Gelatine-Lösung mit 5,4 % enthalten wurde. Die Gelatine-Lösung wurde dabei unabhängig vom

Lösungsmittel nach der Herstellung für 1 Stunde bei 60 °C gelagert, um sie anschließend bei geringerer Viskosität sterilfiltrieren zu können (Filtropur, 0,2 µm, Polyethersulfon-Membranfilter, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Vor der Verwendung beziehungsweise vor der Verdünnung wurde die Gelatine-Lösung noch für 24 Stunden bei 37 °C im Wasserbad (Corio CD-B27, Julabo Labortechnik, Seelbach, Deutschland) gelagert. Bei manchen Versuchen wurde vor der Verdünnung/Verwendung noch tropfenweise NaOH-Lösung (1 M) ergänzt. Die getesteten Basen waren Triethanolamin (TEOA) in Konzentrationen von 1-8 % und Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) in Konzentrationen von 6-22 %. Beide Basen wurden in demineralisiertem Wasser gelöst. Das Oligomer oSMoMA-x wurde in Konzentrationen von 7,5-60 % in DMSO gelöst. Das ursprüngliche Verhältnis der Komponenten zueinander von Gelatine:Base:Oligomer wurde im Laufe der Zeit von 50:30:10 auf 55:30:5 angepasst.

3.2.4.2 Gelherstellung Imagel®

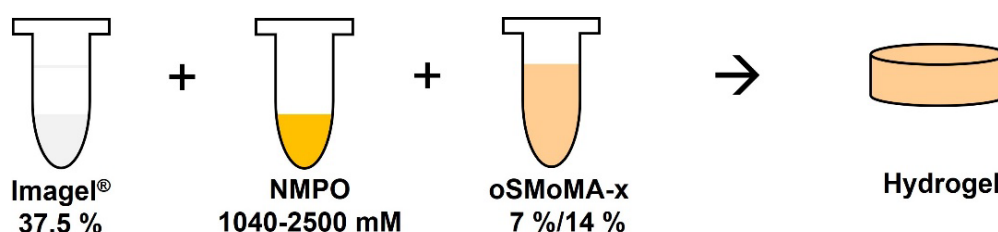


Abbildung 24: Allgemeine Darstellung zur Herstellung des Imagel®-Hydrogels.

Die Herstellungsmethode für das Imagel®-Hydrogel (Abbildung 24) stellt eine Weiterentwicklung einer bereits bekannten Methode dar [20]. Imagel® (37,5 %) wurde, wie die Base NMPO (1040-2500 mM), in einer bestimmten Konzentration in demineralisiertem Wasser gelöst. Aus den beiden Komponenten wurde dann zuerst durch eine 4:1 Mischung (Imagel®:Base) eine Vormischung hergestellt. Die Vormischung wird in dieser Arbeit auch als „Premix“ bezeichnet. Das Oligomer oSMoMA-x wurde zu 7 % oder 14 % in DMSO gelöst. Nebenbei wurden auch noch andere Lösungsmittel wie DMF, Glycofurol, NBP und Glucosenon getestet. Aus der Vormischung und der Lösung mit dem Oligomer wurde im Verhältnis 1:1 das Hydrogel hergestellt.

3.2.4.3 Gelherstellung Chitosan

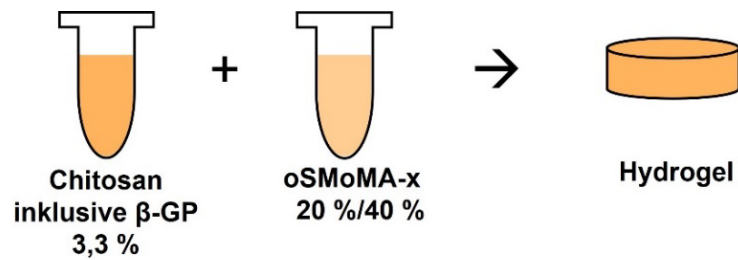


Abbildung 25: Allgemeine Darstellung zur Herstellung des Chitosan-Hydrogels.

Die Herstellungsmethode für das Chitosan-Hydrogel (Abbildung 25) stellt eine Weiterentwicklung einer bereits bekannten Methode dar [29]. Das Chitosan wurde in 10 ml 0,1 M oder 0,05 M HCl gelöst (3,3 %), über Nacht rühren gelassen und anschließend für 15 Minuten bei 121 °C und 2 bar autoklaviert (DX-45, Systec GmbH, Linden, Deutschland). Für die Hydrolyse-Versuche wurde teilweise auch die Sterilisierzeit auf 4 Stunden angehoben. Nach dem Autoklavieren wurden 8 ml reines Nährmedium (DMEM) unter Eiskühlung und Rühren (MR Hei-Tec, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) ergänzt. Um den pH-Wert der Lösung anzupassen, wurden anschließend nochmal 2 ml Beta-Glycerophosphat in DMEM gelöst als Base ergänzt (200 mg oder 100 mg). Die pH-Werte der Lösungen wurden dabei nach jedem Schritt überprüft (FiveEasy, Mettler Toledo, Columbus, USA). Das Oligomer oSMoMA-x wurde hier mit einer Konzentration von 20 % oder 40 % in einer Mischung aus DMSO und Propylenglykol (7:3) gelöst.

3.2.4.4 Nutzung elektronische Pipette

Zum Mischen der Komponenten für die Herstellung der Hydrogele konnte bei Volumina unter 125 µl eine elektronische Pipette (Viaflo 125 µl, Integra, Zizers, Schweiz) genutzt werden. Dabei wurden die Komponenten nacheinander mit einer bestimmten Geschwindigkeit aufgezogen und am Ende gemeinsam an die gewünschte Stelle abgelassen. Eine direkte Vermischung in der Pipettenspitze konnte durch Luft in den Zwischenräumen vermieden werden. Als Beispiel sind hier die Komponenten für die Gelatine-Hydrogele im Verhältnis 55:30:5 µl und 50:30:10 µl gezeigt (Abbildung 26).

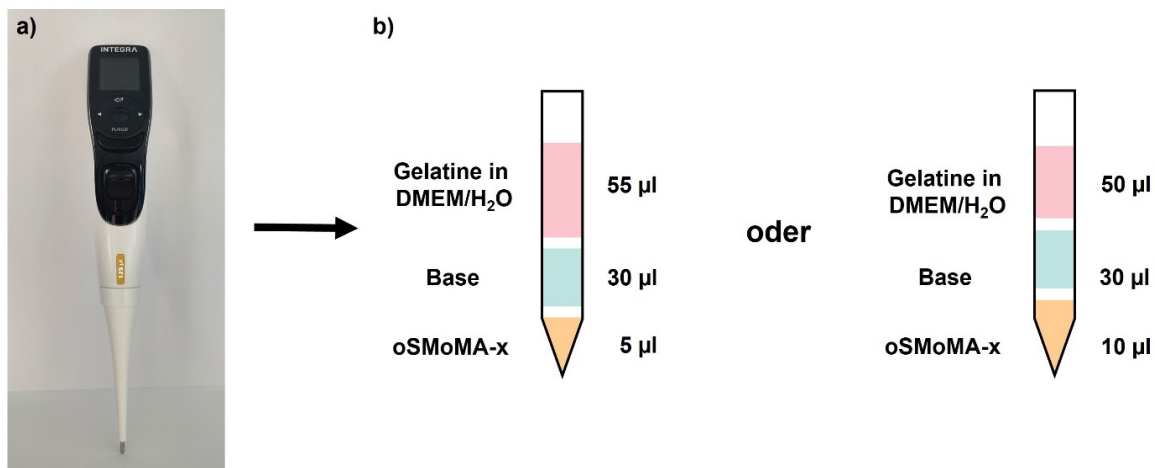


Abbildung 26: Nutzung der elektronischen Pipette zur Herstellung der Hydrogele mit a) Foto der elektronischen Pipette und b) Beispielen für die Variation der verschiedenen Verhältnisse bei den Gelatine-Hydrogelen.

3.2.5 Charakterisierung der Hydrogele

3.2.5.1 Gelierungskinetik

Die Gelierungskinetik der Quervernetzungsreaktion wurde mit einem zeitabhängigen Oszillationstest am Oszillationsrheometer Kinexus Pro (Netzsch, Selb, Deutschland) bestimmt. Als Geometrien wurde ein oberer Kegel (1°, 20 mm) und eine untere Platte (65 mm) genutzt, wie Abbildung 27 zeigt. Um eine Austrocknung während der Messung zu vermeiden, wurde eine Lösemittelfalle, gefüllt mit demineralisiertem Wasser, genutzt. Die Gel-bildenden Bestandteile wurden in vordefinierten Volumina und in bestimmten Verhältnissen mit Hilfe der elektronischen Pipette auf die untere Rheometerplatte (37 °C) gegeben. Die Messung wurde unmittelbar danach bei einer Frequenz von 1 Hz und einer Amplitude von 0,05 % für 1000 Sekunden gestartet, wobei der Speichermodul (G'),

der Verlustmodul (G'') und der Phasenwinkel (P) über den gesamten Zeitraum aufgenommen wurden. Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt. Für die Ergebnisse wurden die gesamten Kurvenverläufe und zusätzlich der Speichermodul (G') bei einer Zeit von 1000 Sekunden betrachtet.

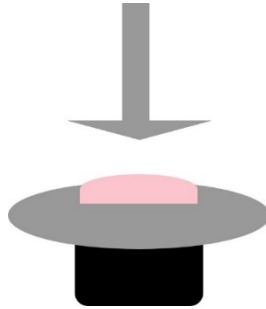


Abbildung 27: Darstellung der Geometrien für den Zeitweep der Gelierungskinetik am Oszillationsrheometer.

3.2.5.2 Herauslösbare Anteile (Leachables) und Wassergehalt

Für die Bestimmung der herauslösbaren Anteile (%) und des Trockengewichts (mg) der Gelstruktur wurden Hydrogele in einem Maßstab von 450 μl in einem Schnappdeckelglas hergestellt. Die jeweiligen Verhältnisse für jedes natürliche Biopolymer wurden dabei beibehalten. Abbildung 28 zeigt beispielhaft, wie die kleineren Hydrogel-Platten aus der großen Hydrogel-Platte gestanzt worden sind. Dafür wurde das Gel mit 0,1 % Amaranth angefärbt.

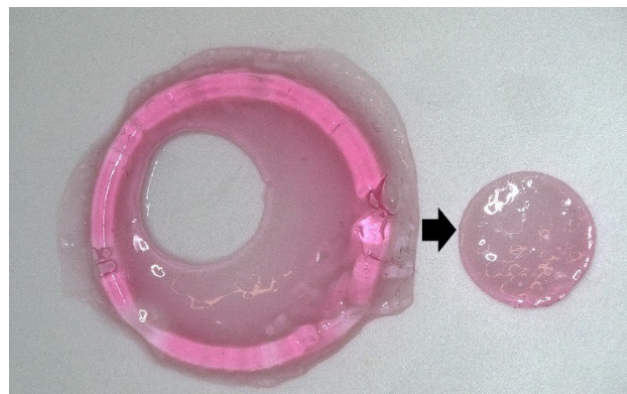


Abbildung 28: Aufnahme einer großen Hydrogel-Platte, die im Schnappdeckelglas hergestellt wurde (links) und einer kleinen daraus gestanzten 8 mm-Platte (rechts).

Angelehnt an die bereits veröffentlichte Methode [48], folgten über 9 Tage verschiedene Trocknungs- und Reinigungsschritte wie in Abbildung 29 dargestellt. Die hydratisierten Gel-Platten wurden lyophilisiert (Alpha 1-4 LDplus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Göttingen, Deutschland), um die herauslösbaren Anteile in Prozent zu bestimmen. Zusätzlich konnte durch das Nassgewicht der kleinen gestanzten 8 mm Platten ($NG_{8\text{ mm Platte}}$) und dem Trockengewicht der großen lyophilisierten Platte ($TG_{\text{große Platte}}$) der Wassergehalt bestimmt werden. Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt.

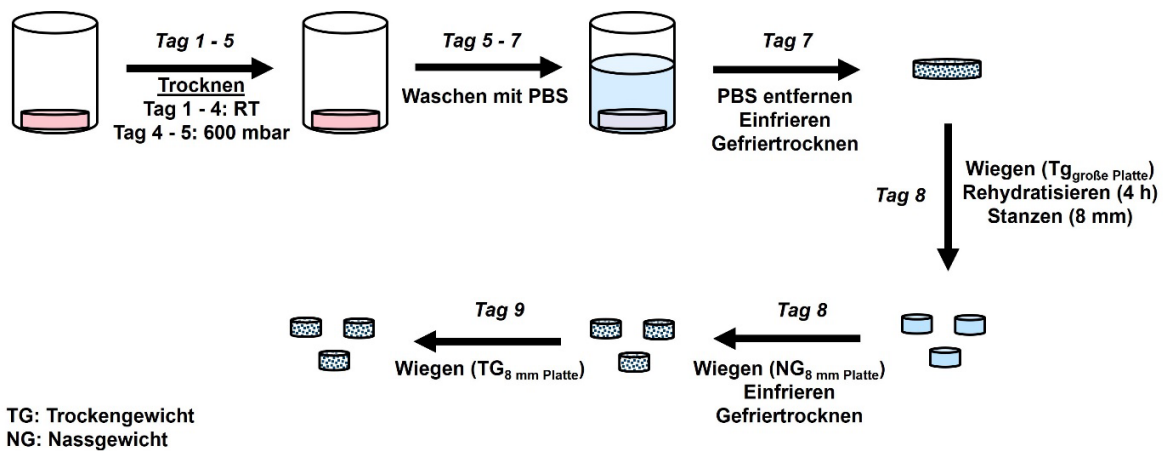


Abbildung 29: Ablauf der Durchführung zur Bestimmung der herauslösbaren Anteile (%), des Trockengewichtes (mg) und des Wassergehaltes (%) des Hydrogels über 9 Tage.

3.2.5.3 Festigkeit der Hydrogel-Platten

Die Festigkeit der zuvor fabrizierten Hydrogel-Platten wurde mittels Frequenztest am Oszillationsrheometer Kinexus Pro (Netzsch, Selb, Deutschland) bestimmt. Als Geometrien wurden eine obere Platte mit 8 mm Durchmesser und eine untere Platte mit 65 mm Durchmesser genutzt, wie Abbildung 30 zeigt.

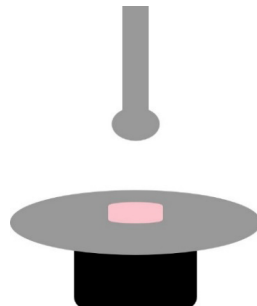


Abbildung 30: Darstellung der Geometrien für den Frequenztest der vorfabrizierten Hydrogel-Platten am Oszillationsrheometer.

Die in PBS rehydratisierte Hydrogel-Platte wurde vor dem Start der Messung auf die untere Geometrie, die eine Temperatur von 37 °C aufwies, aufgebracht und mit einer Normalkraftkontrolle von 0,1 N angefahren, um vorherige Zerstörung zu vermeiden. Der Frequenztest erfolgte bei einer Amplitude von 0,05 % und von 0,1 bis 10 Hz. Der Speichermodul (G'), der Verlustmodul (G'') und der Phasenwinkel (P) wurden aufgenommen. Für die spätere Auswertung der Festigkeit wurde der Speichermodul (G') bei einem Wert von 1 Hz verglichen. Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt.

3.2.5.4 Quervernetzungsgrad (TNBS-Assay)

Das TNBS-Assay wurde genutzt, um freie Aminogruppen in der mit dem Oligomer quervernetzten Gelatine zu bestimmen und daraus indirekt den relativen Quervernetzungsgrad zu errechnen (Formel 2). Dabei wurde einem bereits veröffentlichten Protokoll gefolgt [49].

$$\text{Quervernetzungsgrad [\%]} = \left[1 - \frac{\frac{\text{Absorption}}{\text{Masse}} (\text{Quervernetzte Probe})}{\frac{\text{Absorption}}{\text{Masse}} (\text{Referenz Gelatine})} \right] \times 100 \%$$

Formel 2: Berechnung des Quervernetzungsgrades (TNBS-Assay).

Die Hydrogele wurden zuerst wie oben beschrieben im Schnappdeckelglas hergestellt und behandelt. Nach dem Lyophilisieren der großen Hydrogel-Platten wurden 3 mg des lyophilisierten Hydrogels in eine Schraubröhre (50 ml, Polypropylen, Sarstedt, Göttingen, Deutschland) abgewogen und eine Mischung aus 1 ml Natriumbicarbonat-Lösung (4 %), 4 ml demineralisiertem Wasser und 1 ml 0,5 % TNBS-Reagenz zugegeben. Alles zusammen wurde im Dunklen und bei 40 °C im Trockenschrank (UT 6200, Hereaus, Hanau, Deutschland) für 4 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden 18 ml 6 N HCl zu jeder Schraubröhre (50 ml, Polypropylen, Sarstedt, Göttingen, Deutschland) gegeben, um die Reaktion zu unterbrechen und das Farbprodukt zu stabilisieren. Die Reaktionsmischung wurde erneut im Trockenschrank bei 60 °C für 90 Minuten gelagert. Bei den Blindproben wurde analog verfahren, außer dass die 6 N HCl vor der Zugabe des TNBS-Reagenzes zugegeben worden ist. Für die Referenzproben wurde zuvor eine Kalibriergerade mit genauen Mengen an nicht-quervernetzter Gelatine erstellt und auch analog zu oben verfahren.

Aus jeder Probe wurden 100 µl in eine 96-er Mikrotiterplatte (Polystyrol, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt und die Absorption spektralphotometrisch bei 346 nm vermessen (Spark Multimode Microplate Reader, Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz). Mit der Formel 2 wurde anschließend der Quervernetzungsgrad errechnet.

3.2.6 Zellviabilität

3.2.6.1 Bestimmung der Zellviabilität

Für alle Versuche mit den Zellkulturen wurde das Zubehör vorher durch Autoklavieren (DX-45, Systec GmbH, Linden, Deutschland) sterilisiert und anschließend unter die Laminar-Flow-Werkbank (ScanLaf Mars, LaboGene, Allerød, Dänemark) gebracht. Zubehör, das nicht autoklaviert werden konnte, wurde mit Isopropanol 70 % (V/V) desinfiziert. Alle zu verwendenden Lösungen, die nicht schon vorher im Endgefäß steril waren, wurden mit einem Filter (Filtropur, 0,2 µm, Polyethersulfon-Membranfilter, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) sterilfiltriert und in ein steriles Endgefäß überführt. Geöffnet wurden die Lösungen nur unter der sterilen Laminar-Flow-Werkbank.

3.2.6.1.1 Allgemeine Versuche

Die Zellviabilität der Gelatine-Hydrogele wurde mit dem PrestoBlue®-Zellviabilitätsreagenz und dem WST-8-Zellviabilitätsreagenz an Tag 1, 3 und 7 getestet. Dazu wurden murine embryonale 3T3-Fibroblasten in T75-Zellflaschen aus Polystyrol (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) kultiviert. Als Nährmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS) und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet. Vor dem Beginn des Experimentes wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml 0,05 % Trypsin-EDTA-Lösung von dem Flaschenboden abgelöst. Nach Zugabe von weiteren 8 ml Nährmedium konnten die Zellen gezählt und die nötige Konzentration angepasst werden. Die Konzentration wurde so gewählt, dass in jedem Hydrogel eine Zelldichte von 180.000 Zellen/90 µl (2 Mio. Zellen/ml) resultierte. Zur Herstellung des Gels wurde, wie Abbildung 31 zeigt, die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:2 mit steriler Gelatine-Lösung (8,1 %) gemischt, sodass eine Endkonzentration von 5,4 % resultierte. Diese Lösung wurde mit der Base und dem Oligomer in einem Verhältnis von 55:30:5 µl oder 50:30:10 µl mit der

elektronischen Pipette in Polypropylen-Formen, welche in 24-er Mikrotiterplatten (Polystyrol, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) saßen, pipettiert und bei 37 °C und 5 % CO₂-Umgebung im Inkubator (CellXpert C170, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gelieren gelassen.

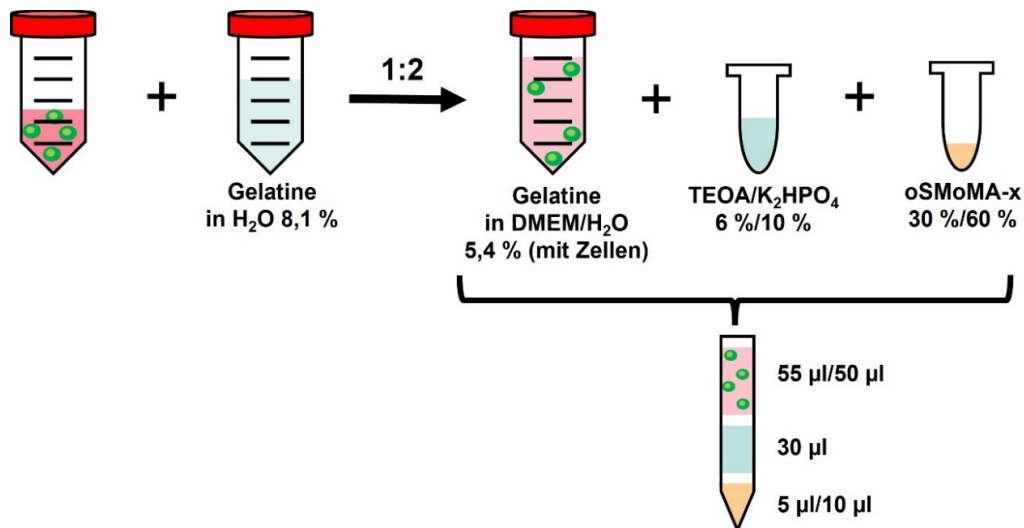


Abbildung 31: Zusammensetzung der Gelatine-Hydrogele zur Bestimmung der Zellviabilität als einzelne Komponenten und zusammen in der Pipettenspitze der elektronischen Pipette (unten).

Nach 20 Minuten Gelierungszeit wurden zu jedem Hydrogel 1,2 ml Nährmedium zugegeben, wobei 1 ml des Nährmediums nach 1 Stunde gewechselt und gegen frisches Nährmedium ausgetauscht wurden. Bei den Blindproben wurde reines Nährmedium ohne Zellen verwendet und analog verfahren. Das Nährmedium wurde bei allen Proben alle 48 Stunden gewechselt. Bei einem Teil der Versuche wurde Rattenschwanz-Kollagen als Vergleichsstandard genutzt. Dafür wurden für die Gelierung 1/9 Volumen 10x MEM mit Phenolrot (100 mg/l) unter Eiskühlung zu dem Rattenschwanz-Kollagen gegeben und mit 5 M NaOH titriert bis der Farbumschlag von Gelb nach Rot zu sehen war [102]. Anschließend wurde das Hydrogel für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert (CellXpert C170, Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

3.2.6.1.2 Langzeitexperiment

Die Zellviabilität der Gelatine-Hydrogele wurde für das Langzeitexperiment mit dem PrestoBlue®-Zellviabilitätsreagenz an Tag 1, 2, 5, 7, 14 und 21 getestet. Dazu wurden primäre humane Fibroblasten in T75-Zellflaschen aus Polystyrol (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) kultiviert. Als Nährmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS) und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet. Das weitere Vorgehen wurde wie in 3.2.6.1.1 beschrieben durchgeführt. Ein Unterschied war, dass am Ende, ohne Überführung in eine 96-er Mikrotiterplatte (Polystyrol, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland), sondern direkt in der 24-er Mikrotiterplatte (Polystyrol, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gemessen wurde.

3.2.6.1.3 Untersuchungen mit Mesenchymalen Stammzellen

Das Vorgehen für das Experiment mit mesenchymalen Stammzellen der Tränendrüse des Schweins erfolgt analog zu 3.2.6.1.1. Aufgrund von unterschiedlichen Bedürfnissen der Zellen wurde als Nährmedium α -MEM statt DMEM verwendet und die Inkubation erfolgte in hypoxischer Atmosphäre ohne CO₂. Zudem wurden als Probengröße Stammzellen von 5 verschiedene Schweine mit je 2 Proben getestet.

3.2.6.2 Zellviabilitätsreagenzien

3.2.6.2.1 PrestoBlue®-Zellviabilitätsreagenz

Vor der Zugabe von 100 μ l Zellviabilitätsreagenz (10 % V/V) wurden 1000 μ l Nährmedium entnommen und 800 μ l frisches Nährmedium hinzugegeben. Anschließend wurde für 90 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂-Umgebung inkubiert (CellXpert C170, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). 100 μ l der Lösung wurden mit der Eppendorf-Pipette entnommen und in eine 96-er Mikrotiterplatte (Polystyrol, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte spektralphotometrisch bei einer Anregungswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm (Spark Multimode Microplate Reader, Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz).

Die Zellviabilität wurde in der Einheit RFU angegeben und ein höherer RFU-Wert entsprach einer höheren Zellviabilität. Die Experimente wurden vierfach durchgeführt und die Blindproben ohne Zellen zweifach. Das Ergebnis der Blindproben wurde von den Proben abgezogen.

3.2.6.2.2 WST-8-Zellviabilitätsreagenz

Vor der Zugabe von 100 µl Zellviabilitätsreagenz (10 % V/V) wurden 1000 µl Nährmedium entnommen und 800 µl frisches Nährmedium hinzugegeben. Anschließend wurde für 90 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂-Umgebung inkubiert (CellXpert C170, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). 100 µl der Lösung wurden mit der Eppendorf-Pipette entnommen und in eine 96-er Mikrotiterplatte (Polystyrol, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Die Messung der Absorption erfolgte spektralphotometrisch bei 450 nm (Spark Multimode Microplate Reader, Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz). Die Zellviabilität wurde mit den Absorptionswerten angegeben und eine höhere Absorption entsprach einer höheren Zellviabilität. Die Experimente wurden vierfach durchgeführt und die Blindproben ohne Zellen zweifach. Das Ergebnis der Blindproben wurde von den Proben abgezogen.

3.2.7 Zytotoxizität von DMSO und Oligomer

Zur Bestimmung der Zytokompatibilität von DMSO als Lösungsmittel für das Oligomer und vom hydrolysierten bzw. nicht-hydrolysiertem Oligomer wurden die murinen embryonalen 3T3-Fibroblasten ebenfalls wie in 3.2.6.1.1 beschrieben, für die Experimente vorbereitet und geerntet. Für den Versuch wurden 10.000 Zellen pro 100 µl Nährmedium (mit FBS und Penicillin/Streptomycin) in einer 96-er Mikrotiterplatte (Polystyrol, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) pro Mikrotiter ausgesät und für 24 Stunden inkubiert (CellXpert C170, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die Blindproben enthielten dabei nur reines Nährmedium ohne Zellen. Anschließend wurde das Nährmedium entfernt und neues Nährmedium ergänzt, welches bestimmte Konzentrationen an reinem DMSO, hydrolysiertem Oligomer in DMSO oder demineralisiertem Wasser oder nicht-hydrolysiertes Oligomer in DMSO enthielt. Die Inkubation mit potenziell toxischem Zusatz erfolgte für jeweils 20 und 60 Minuten. Danach wurde das verunreinigte Nährmedium wieder entfernt, einmal mit 100 µl PBS gewaschen und 100 µl

frisches Nährmedium ergänzt bevor 10 µl des WST-8-Zellviabilitätsreagenz zu den Proben hinzugegeben wurde. Nach 2 Stunden Inkubation erfolgte die Messung der Absorption spektralphotometrisch bei 450 nm (Spark Multimode Microplate Reader, Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz). Auf jeder Platte wurden 2 Kontrollen durchgeführt, bei denen es keine Verunreinigung im Nährmedium gab. Die Experimente wurden vierfach durchgeführt und die Blindproben ohne Zellen zweifach. Zur Bestimmung der genauen Zellzahl jeder Probe wurde zuvor eine Kalibriergerade mit bestimmten Zellzahlen erstellt und mit dieser die genaue Anzahl der Zellen pro Konzentration ermittelt.

3.2.7.1 Hydrolyse des Oligomers

Um das Oligomer beziehungsweise die enthaltenen Anhydride zu hydrolysieren, wurden etwa 500 mg Oligomer in 10 ml demineralisiertem Wasser gegeben. Anschließend wurde tropfenweise 4 M Natriumhydroxid-Lösung zugegeben, bis das Oligomer sich aufgelöst hatte. Nach einer 30-minütigen Wartezeit wurde die Lösung mit 1 M HCl-Lösung neutralisiert. Es folgte eine mehrstufige Dialyse (Dialysesystem Spectra/Por® Float-A-Lyzer® G2 Füllvolumen 5 ml, 100-500 Dalton, Repligen, Waltham, Massachusetts, USA). Nach 30 Minuten, einer Stunde, 3 Stunden und nach einer Nacht wurde das demineralisierte Wasser für die Dialyse getauscht. Als Letztes wurde die Lösung vor dem Gebrauch lyophilisiert (Alpha 1-4 LDplus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Göttingen, Deutschland).

3.2.8 Entwicklung der Biotinten

Als Vorbereitung für den 3D-Druck der Hydrogele als Biotinte musste eine Hydrogel-Zusammensetzung gefunden werden, die eine akzeptable Festigkeit als Hydrogel (Speichermodul G') und eine gute Zellkompatibilität zeigte. Darüber hinaus spielte die Gelierungskinetik einen entscheidenden Prozess bei dem Vorgang des 3D-Drucks. Für die Entwicklung des Hydrogels als Biotinte wurde nur das Gelatine-Hydrogel betrachtet. Die ursprüngliche Zusammensetzung (siehe Tabelle 2) wurde in vielen Punkten, die an dem roten Pfeil erkenntlich sind, weiterentwickelt. Unter anderem wurde das Lösungsmittel für die Gelatine und das Oligomer verändert, die Base von TEOA zu K_2HPO_4 geändert, die Konzentration der Base und des Oligomers angepasst, verschiedene Oligomere

mit unterschiedlichen MA-Gehalten ausprobiert und das Verhältnis der Komponenten zueinander angepasst. Bei der Gelatine-Lösung wurden zudem auch die pH-Werte der verschiedenen Lösungen gemessen (FiveEasy, Mettler Toledo, Columbus, USA).

Tabelle 2: Ursprüngliche Zusammensetzung der Gelatine-Hydrogele; die grau unterlegten Felder sind die Stellen, an denen im Laufe der Zeit Änderungen vorgenommen wurden.

Komponente	Lösungsmittel	Stammlösung		Im Hydrogel [%]
		%	µl	
Gelatine	Wasser	5,4	50	3,0
TEOA	Wasser	8,3	30	2,8
Oligomer	DMSO:NMP (3:1)	60	10	6,7

3.2.8.1 Design of Experiments (DoE)

Die Auswirkungen der Konzentrationen der verschiedenen Komponenten auf die Festigkeit des Gelatine-Hydrogels (Speichermodul G') wurden mit Hilfe statistischer Versuchsplanung (Design of Experiment, DoE) am Oszillationsrheometer Kinexus Pro (Netzsch, Selb, Deutschland) analysiert. Dafür wurde ein CCC-Versuchsplan (engl. central composite circumscribed) erstellt. Die drei wichtigen Parameter waren die Konzentrationen der Lösungen von der Gelatine, der Base (TEOA) und des Oligomers (oSMoMA-3,5) im resultierenden Hydrogel. Das Verhältnis der Komponenten zueinander wurde nicht variiert und lag bei 55:30:5 µl (Gelatine:Base:Oligomer). Die Gelatine wurde wie vorher beschrieben zuerst in demineralisiertem Wasser gelöst und dann mit DMEM 2:1 verdünnt. Die Konzentrationen der Stammlösungen wurden so gewählt, dass die gewünschten Endkonzentrationen im Gelatine-Hydrogel, mit dem gewählten Verhältnis von 55:30:5 µl, resultierten. Am Oszillationsrheometer wurde der zeitabhängige Oszillationstest, wie in Kapitel 3.2.5.1 beschrieben, durchgeführt und als Zielgröße der Speichermodul (G') bei 1000 Sekunden gewählt. Die Experimente für den CCC-Versuchsplan wurden in randomisierter Reihenfolge durchgeführt. Insgesamt wurden 17 Läufe mit 3 Faktoren und 2 Stufen, 2 Sternpunkten für jeden Faktor sowie Center Points bei den Läufen 1,7 und 17 durchgeführt.

Dabei wurden die Messungen am Oszillationsrheometer drei Mal durchgeführt und die Versuche in drei Blöcke eingeteilt. Die Datenverarbeitung wurde mit Modde 13 (Umetrics, Schweden) auf einem 5 %-Signifikanzniveau durchgeführt. Als Modell wurde eine „projection to latenten structures by partial least square regression“ (PLS) verwendet.

Tabelle 3: CCC-Versuchsplan mit Endkonzentrationen der verschiedenen Komponenten des Gelatine-Hydrogels, die für das Design of Experiments (DoE) verwendet worden sind. Dabei wurden 17 Läufe durchgeführt.

Lauf	Konzentration im Hydrogel [%]		
	Gelatine	TEOA	oSMoMA-3,5
1	3,30	2,35	1,70
2	3,30	1,76	1,70
3	3,50	2,70	1,20
4	3,10	2,00	1,20
5	3,30	2,35	2,54
6	2,96	2,35	1,70
7	3,30	2,35	1,70
8	3,50	2,00	2,20
9	3,30	2,35	0,86
10	3,50	2,00	1,20
11	3,30	2,94	1,70
12	3,10	2,70	1,20
13	3,50	2,70	2,20
14	3,64	2,35	1,70
15	3,10	2,00	2,20
16	3,10	2,70	2,20
17	3,30	2,35	1,70

3.2.9 3D-Druck

Für die Druck-Versuche mit den Hydrogelen wurde der Creality CR-20 Pro (Shenzhen Creality 3D Technology, Shenzhen, China) genutzt. Um den Transport eines konstanten Volumens pro Umdrehung zu ermöglichen (9,4 µl) und somit ein Hydrogel statt eines kommerziellen Filaments zu drucken, wurde der ursprüngliche Druckkopf gegen einen bzw. zwei Druckköpfe Puredyne® (ViscoTec Pumpen- u. Dosiertechnik GmbH, Töging am Inn, Deutschland) ausgetauscht und für die Bedienung das neue Mainboard Bigtree tech SKR 2 (Shenzhen Bigtree technology, Shenzhen, China) in den Drucker implementiert. Der Puredyne®-Druckkopf mit der Exzentertechnologie ermöglichte eine volumetrische Dosierung von Biomaterialien mit niedriger bis hoher Viskosität [50]. Für spätere temperierbare Druckversuche wurde noch eine Temperiereinheit (Puredyne® temperature control b5, ViscoTec Pumpen- u. Dosiertechnik GmbH, Töging am Inn, Deutschland) verwendet. Die Einstellung der Temperatur von 37 °C wurde über das Labornetzgerät PS2107 (Sky TopPower, Shenzhen Sky TopPower, Shenzhen, China) sichergestellt.

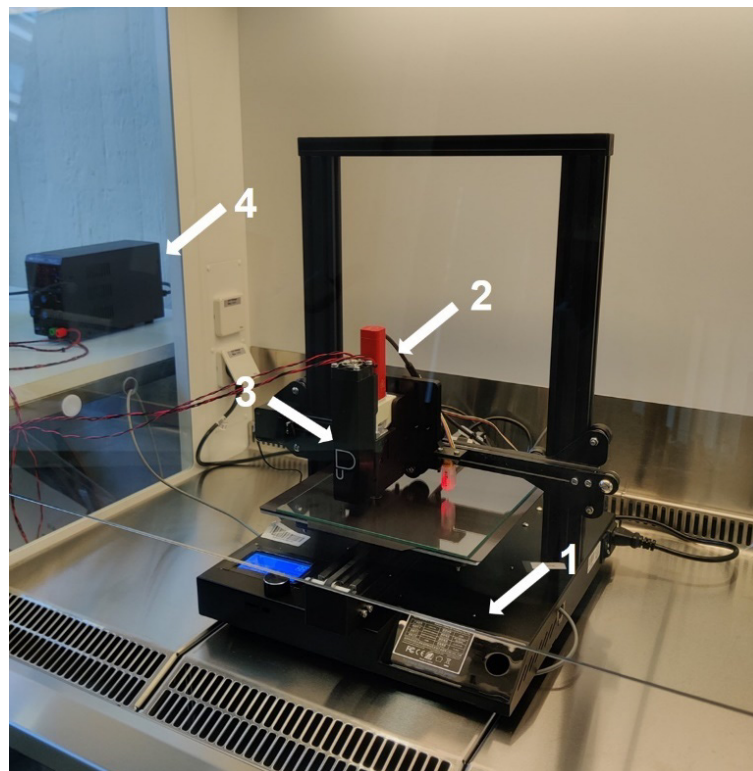
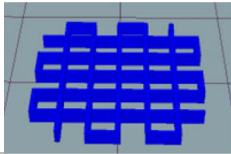
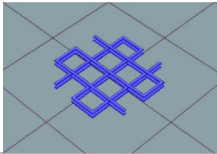
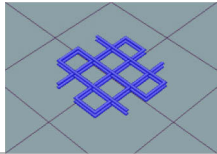


Abbildung 32: Aufbau mit 1) Creality CR-20 Pro Drucksystem, 2) Puredyne®-Druckkopf, 3) Temperiereinheit und 4) Labornetzgerät zur Steuerung der Temperiereinheit.

Als Druckform für alle Versuche diente eine rechteckige Form mit Gitterstruktur, die durch Anpassung des Füllungsgrades und der Füllungsart, beeinflusst werden konnte (Tabelle 4).

Tabelle 4: Druckparameter (Gedruckte Form, Größe, Füllungsart, Füllungsgrad und Anzahl der Druckschichten) für die verschiedenen Versuche zum 3D-Druck.

	Vorversuch mit Imagel®	Druck der zellbeladenen Hydrogele	Versuch Massenschwankung
Bild Repetier-Host			
Größe [mm x mm]	15 x 15	12 x 12	12 x 12
Füllungsart	Geradlinig	Geradlinig	Geradlinig
Füllungsgrad [%]	10	15	15
Anzahl Druckschichten	2	4	2 und 4

Für die Herstellung der Halterung der beiden Druckköpfe beim Zweikomponentendruck wurde ein UltiMaker S3 (UltiMaker, Geldermalsen, Niederlanden) genutzt. Das Material dafür war ein kommerzielles Filament (EasyFil PLA, Formfutura), welches mit einer 0,4 mm Dosierkanüle bei Standardeinstellungen verdrukt wurde (Fused Deposition Modeling (FDM)). Der Adapter zur Verbindung der beiden Druckköpfe wurde mit dem Stereolithographie (STL)-Verfahren des Form 3 (Formlabs, Somerville, USA) -Druckers gedruckt, wobei ein flüssiges Harz (Resin) durch UV-Bestrahlung ausgehärtet wurde.

Der Adapter wurde aus dem Formlabs Clear Resin® unter Standardeinstellungen mit einer Auflösung von 50 µm gedruckt und nach dem Druck für 20 Minuten mit Isopropanol gewaschen, um anhaftendes, nicht ausgehärtetes Harz zu entfernen. Anschließend wurde für 15 Minuten bei 60 °C mit UV-Licht (405 nm) nachgehärtet.

3.2.9.1 Software

Die Druckobjekterstellung als CAD-Datei (CAD = *engl. Computer-Aided Design*) erfolgte mit Autodesk Fusion 360 (Version 2.0.18477 und Version 2.0.16486, Autodesk GmbH, Dublin, Irland). Nach der Umwandlung der CAD-Dateien in STL-Dateien wurden aus diesen Dateien, vom Slicer Slic3r (Version 1.3.0, GNU Affero General Public License, Version 3, Alessandro Ranellucci, Italien), Cura (Version 5.0.0, UltiMaker, Geldermalsen, Niederlanden) für den 3D-Druck der Halterung und Preform (Version 3.29.1, Formlabs, Somerville, USA) für den 3D-Druck des Adapters, G-Codes generiert. Die Befehle als G-Codes für die Druckersteuerung des Creality CR-20 Pro (Shenzhen Creality 3D Technology, Shenzhen, China) konnten dann von Repetier-Host (Version 2.3.2 2011-2022, Hot-World GmbH & Co. KG, Willich, Deutschland) umgesetzt werden. Die Steuerung der Temperiereinheit erfolgte dabei über die TEC Service Software (Version 5.10, Meerstetter Engineering GmbH, Rubigen, Schweiz).

3.2.9.2 Vorversuch mit dem Imager®-Hydrogel

Bevor die Biotinten gedruckt werden konnten, wurde Vorversuche am 3D-Drucker aus einer Kartusche mit Imager®-Hydrogelen durchgeführt. Die Herstellung des Hydrogels erfolgte dabei wie in 3.2.3.2 beschrieben. Für die Vorversuche wurde eine 7%ige Lösung des Oligomers oSMoMA-7,5 in DMSO genutzt. Als Base wurde ebenfalls NMPO in der Konzentration 1740 mM gewählt. Das Oligomer und die jeweiligen Konzentrationen wurden vorher in anderen Vorversuchen bestimmt und das Hydrogel mit dem besten Ergebnis zur Weiterverwendung ausgewählt. Die Druckkartusche mit einem Fassungsvermögen von insgesamt 5 ml wurde mit der Vormischung von 1 ml und der Oligomer-Lösung von 1 ml gefüllt (gesamt 2 ml). Für die bessere Visualität wurde 1 Tropfen Amarant (0,1 %) ergänzt, sodass die Lösung in der Kartusche sich pink färbte. Ab dem Mischen der beiden Komponenten wurde die Zeit gestoppt bis der Druckvorgang mit 2 Druckschichten gestartet wurde (Abbildung 33). Dabei wurden die Zeitpunkte von 5, 8, 11, 14 und

17 Minuten gewählt und das gedruckte Hydrogel anschließend visuell am Digitalmikroskop betrachtet (VHX-7000, Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland). Es wurde für diesen Vorversuch mit einer Druckgeschwindigkeit von 3 mm/s, einer Schichtdicke von 0,15 mm und einer Extrusionsdicke von 200 % gedruckt. Die eingesetzte Nadel war eine konische Dosiernadel (Polypropylen, Vieweg GmbH, Kranzberg, Deutschland) mit 0,15 mm Durchmesser. Gesteuert werden konnte die Extrusionsdicke außerdem über den Extrusionsmultiplikator, welcher die Feinabstimmung der Extrusionsdurchflussrate beeinflusst. Dieser wurde hier auf einen Wert von 20 gesetzt.

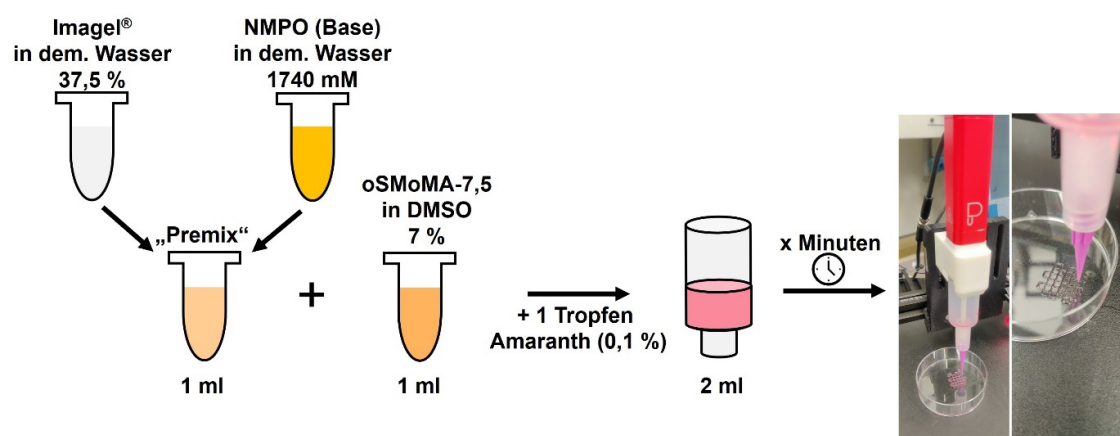


Abbildung 33: Zusammensetzung des ImageI®-Hydrogels für den 3D-Druck mit der Zugabe eines Tropfens Amarant (0,1 %) für die bessere Sichtbarkeit des gedruckten Hydrogels.

3.2.9.3 3D-Druck des Hydrogels als Biotinte

Nach erfolgreicher Entwicklung von zwei Biotinten innerhalb der Gelatine-Hydrogele konnten diese für den 3D-Druck von zellbeladenen Konstrukten aus einer Kartusche genutzt werden. Zuerst wurde der 3D-Drucker mit Isopropanol 70 % (V/V) desinfiziert und unter eine sterile Laminar-Flow-Werkbank (ScanLaf Mars, LaboGene, Allerød, Dänemark) gebracht. Das gesamte Zubehör, welches mit den Zellen in Kontakt kam, wurde vorher auch durch Autoklavieren (DX-45, Systec GmbH, Linden, Deutschland) oder Desinfizieren mit Isopropanol 70 % (V/V) sterilisiert (siehe Kapitel 3.2.6.1). Den Aufbau der genutzten Geräte und Materialien wird in Abbildung 34 gezeigt.



Abbildung 34: Aufbau Zelllabor für den 3D-Druck von zellbeladenen Hydrogel-Konstrukten mit
1) LAF-1 für die Vorbereitung der Zellen, 2) LAF-2 für den 3D-Druck der zellbeladenen Hydrogele, 3)
Steuerung des 3D-Drucks, 4) Kontrolle der Temperatureinheit und 5) 3D-Drucker mit eingebautem Druckkopf
und Temperatureinheit.

Die rechte Laminar-Flow-Werkbank (1) wurde für die Aufbereitung der Zellen und die Vorbereitung der Biotinten genutzt, während die linke Laminar-Flow-Werkbank (2) für den 3D-Druck (5) der Zellen diente. Die Steuerung erfolgte über den PC, der ganz links auf der Abbildung zu sehen ist (3) und die Einstellung der Temperatur über das Netzgerät (4) zwischen PC und Laminar-Flow-Werkbank. Anschließend wurden die murinen embryonalen 3T3-Fibroblasten, wie in Kapitel 3.2.6.1.1 beschrieben worden ist, vorbereitet und in gewünschter Zelldichte in 400 µl Nährmedium (DMEM) gebracht (2 Mio. Zellen/ml). Die 400 µl wurden dann mit 800 µl steriler Gelatine-Lösung (8,1 %) gemischt, um eine Konzentration an Gelatine von 5,4 % zu enthalten. 1100 µl dieser Lösung wurden dann mit 600 µl steriler Basen-Lösung und 100 µl steriler Oligomer-Lösung in der Kartusche vermischt und in den auf 37 °C beheizten Druckkopf Puredyne® (ViscoTec Pumpen- u. Dosiertechnik GmbH, Töging am Inn, Deutschland) überführt (Abbildung 35).

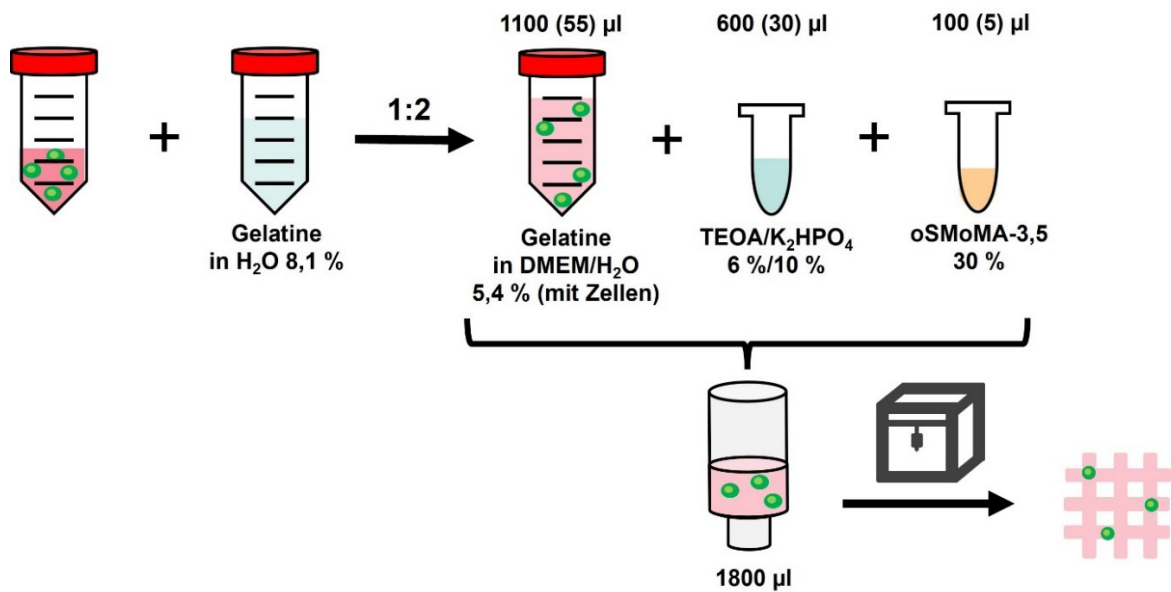


Abbildung 35: Zusammensetzung der Gelatine-Hydrogele mit Volumen-Angaben für den 3D-Druck der zellbeladenen Hydrogele als einzelne Komponenten und zusammen in der Kartusche des 3D-Druckers mit resultierendem Hydrogel-Konstrukt (unten). Dafür wurde das Verhältnis der Komponenten zueinander von 55:30:5 eingehalten und in den Volumina auf etwa 2 ml angepasst, um die Kartusche des 3D-Druckers ausreichend zu füllen.

Der 3D-Druck des zellbeladenen Hydrogels erfolgte unter einer Laminar-Flow-Werkbank (ScanLaf Mars, LaboGene, Allerød, Dänemark) und auf ein 13 mm steriles Deckgläschen (PETG, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), um es problemlos in die 12-er Mikrotiterplatte (Polystyrol, Corning Costar, High Wycombe, UK) überführen zu können. Das sterile Deckglas lag dabei auf einer sterilen Glasplatte, um einen besseren beweglichen Unterboden für den 3D-Druck zu haben (Abbildung 36).

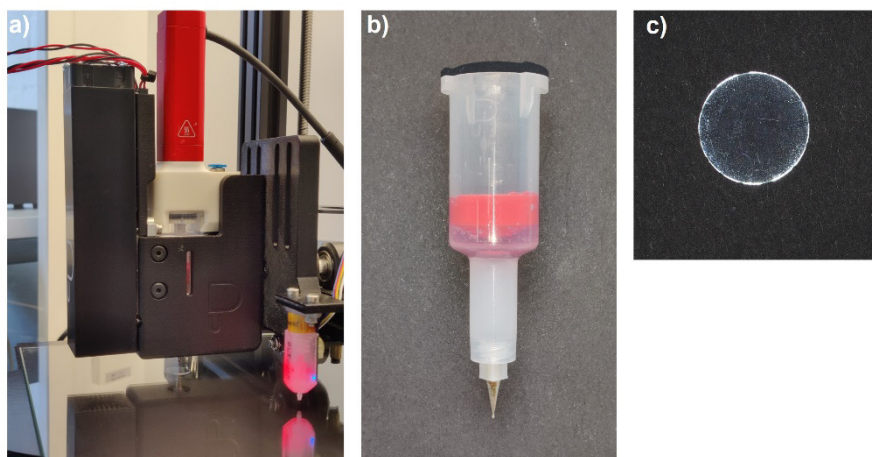


Abbildung 36: Prinzip des Zelldrucks mit a) Druckkopf eingebaut in die Temperiereinheit, b) Kartusche des 3D-Druckers mit zellbeladenem Hydrogel befüllt (unter dem roten Stopfen) und c) steriles Deckglas als transportfähige Druckunterlage.

Für den Druckprozess wurden Mikro-Präzisions-Dosiernadeln (Super Micro Dosiernadel, Vieweg GmbH, Kranzberg, Deutschland) mit zwei unterschiedlichen Größen genutzt und verglichen. Zum einen wurde eine Nadel mit einem Innendurchmesser von 0,44 mm (25 Gauge) und zum anderen von 0,16 mm (34 Gauge) benutzt (Abbildung 37).

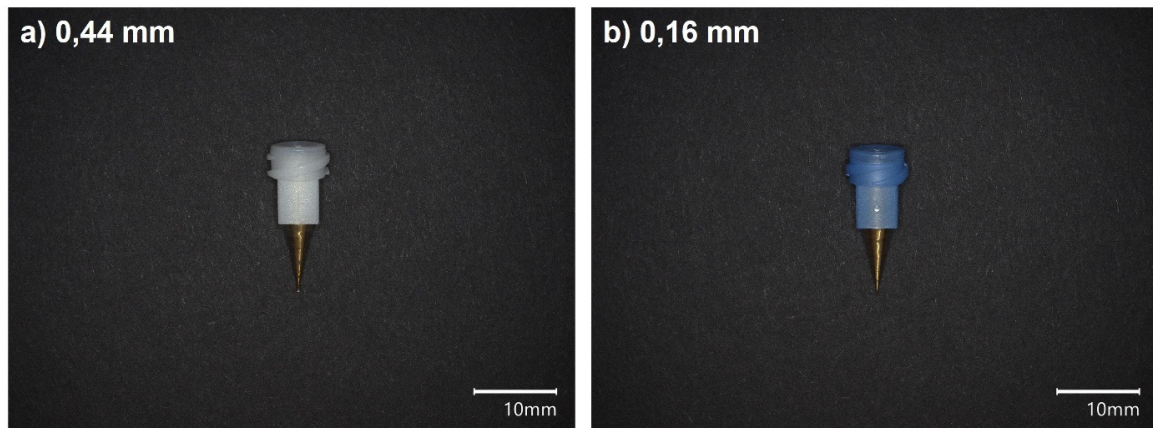


Abbildung 37: Mikro-Präzisions-Dosiernadeln für den 3D-Druck von zellbeladenen Hydrogel-Konstrukten mit a) 0,44 mm (25 Gauge) - und b) 0,16 mm (34 Gauge)-Innendurchmesser; aufgenommen mit dem Digitalmikroskop (VHX-7000, Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland).

Jedes Hydrogel wurde dabei achtfach mit jeder Biotinte und jeder Dosiernadel gedruckt und anschließend mit dem WST-8-Zellviabilitätsreagenz auf Zellviabilität und unter dem Durchlichtmikroskop überprüft. Dafür wurden immer zwei Hydrogel-Konstrukte aus einer Kartusche gedruckt, wobei nur die erste für die Auswertung berücksichtigt wurde. Bei den Blindproben wurde das Hydrogel zweifach und ohne Zellen gedruckt (DMEM ohne Zellsuspension).

3.2.9.3.1 Massenschwankung der Hydrogele

Um die Massenschwankungen der gedruckten Hydrogele zu betrachten, wurden die beiden Biotinten (ohne Zellen), wie in 3.2.8.3 beschrieben worden ist, gedruckt. Dabei wurden auch beide Dosiernadeln miteinander verglichen und in einer Versuchsreihe 2 Druckschichten und in der anderen 4 Druckschichten gedruckt. Der Druck erfolgte auf eine zuvor tarierte (LS 120A, Precisa, Dietikon, Schweiz) Druckunterlage, wie in Abbildung 38 dargestellt.



Abbildung 38: Tarnierte Unterlage für den 3D-Druck des Hydrogels.

Nach jedem gedruckten Hydrogel wurde die Masse gewogen (Practum224-1S, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland) und notiert. Nach 1, 2 und 4 Druckschichten wurden zudem auch Bilder der gedruckten Hydrogele am Digitalmikroskop (VHX-7000, Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland) aufgenommen und miteinander verglichen.

3.2.9.4 Zellviabilität der gedruckten Konstrukte

Unmittelbar nach dem 3D-Druck wurden die zellbeladenen Hydrogele mit dem Deckglas in eine 12-er Mikrotiterplatte (Polystyrol, Cole-Parmer Instrument Company, Vernon Hills, Illinois, USA) überführt und für 20 Minuten bei 37 °C und bei 5 % CO₂-Umgebung im Inkubator (CellXpert C170, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gelieren gelassen. Anschließend wurden zu jedem gedruckten Hydrogel 2 ml Nährmedium zugegeben, wobei 1 ml des Nährmediums nach 1 Stunde gewechselt und gegen frisches Nährmedium ausgetauscht wurden. Das Nährmedium wurde bei allen Proben alle 48 Stunden gewechselt. Vor der Zugabe von 200 µl Zellviabilitätsreagenz (10 % V/V) wurden 1 ml Nährmedium entnommen und 1 ml frisches Nährmedium wieder hinzugegeben. Anschließend wurde, wie in Kapitel 3.2.6.2.2 mit dem WST-8-Zellviabilitätsreagenz beschrieben worden ist, weiter verfahren.

3.2.9.5 Mikroskopische Untersuchung der gedruckten Konstrukte

Die gedruckten zellbeladenen Hydrogele, die auch mit WST-8-Zellviabilitätsreagenz behandelt worden waren, konnten anschließend auch nach 1, 3 und 7 Tagen mit Durchlicht unter einem Mikroskop (Leica DM IL LED, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) betrachtet und verglichen werden. Dazu wurden die Objektive mit 10-facher- und 20-facher Vergrößerung genutzt.

3.2.9.6 Zubehörkonstruktion für den Zweikomponentendruck

Um für den Zweikomponentendruck beide Druckköpfe, inklusive einer Temperiereinheit (Puredyne® temperature control b5, ViscoTec Pumpen- u. Dosiertechnik GmbH, Töging am Inn, Deutschland), am Drucker befestigen zu können, musste eine neue Halterung für die beiden Druckköpfe entworfen und 3D-gedruckt werden (Abbildung 39). Diese ermöglichte, dass der optimale Abstand und Winkel der beiden Druckköpfe zueinander eingehalten werden konnten. Für die Verbindung der beiden Druckköpfe wurde ein Y-Verbindungsstück mit zwei weiblichen und einem männlichen Luer-Lock entworfen, sodass es möglich war unten eine Dosiernadel zu verwenden und oben beide Druckköpfe über Luer-Lock miteinander zu verbinden.

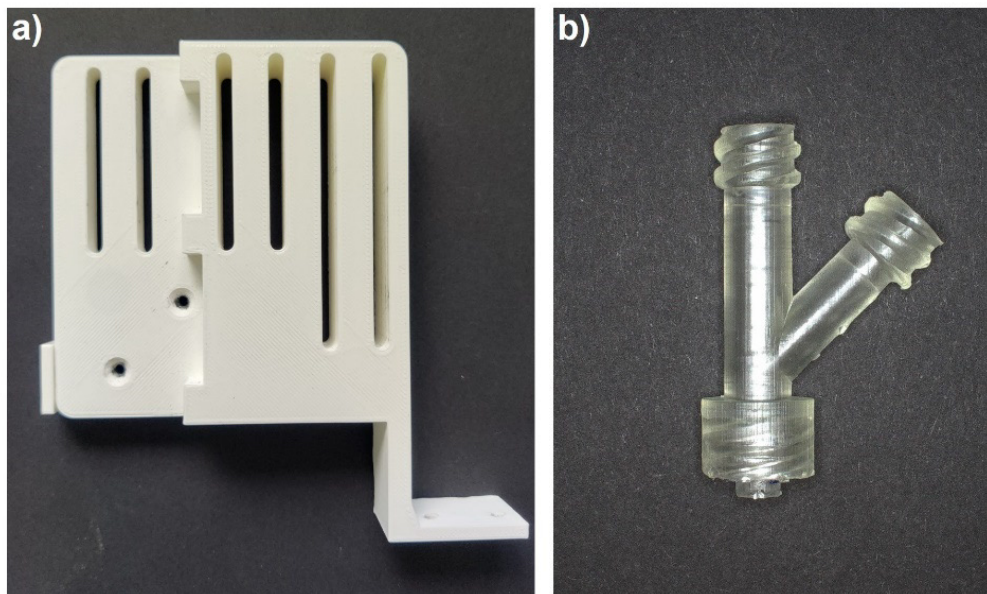


Abbildung 39: Selbst entworfenes und 3D-gedrucktes Zubehör für den Zweikomponentendruck mit
a) Halterung für beide Druckköpfe und b) Y-Verbindungsstück.

3.2.9.7 Zweikomponentendruck

Im ersten Teil des Versuches für den Zweikomponentendruck wurden beide Druckköpfe in paralleler Anordnung zueinander auf die selbst entworfene Halterung des Druckers aufgebracht. Beide Kartuschen wurden mit demineralisiertem Wasser gefüllt und erhielten konische Dosiernadeln (Polypropylen, Vieweg GmbH, Kranzberg, Deutschland) mit 0,15 mm Durchmesser, welche nicht miteinander verbunden worden waren. Beim Zweikomponentendruck ist von Bedeutung, dass die Gelatine-Lösung und die Basen-Lösung zuvor in eine Kartusche, die auf 37 °C beheizt wurde, gebracht wurden und die Oligomer-Lösung eine einzelne Kartusche erhielt. Das gewünschte Verhältnis von 85:5 bzw. 17:1 (Gelatine + Base:Oligomer) für den späteren Zelldruck wurde dann durch manuelle G-Codes in die Befehlseingabe inkludiert und der Druck in zwei Petrischalen (60 x 15 mm, Polystyrol, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gestartet. Die Petrischalen (60 x 15 mm, Polystyrol, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) wurden zuvor tariert und nach Ende des Druckes gewogen (Practum224-1S, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland), um die Massenverhältnisse zueinander zu betrachten. Für diesen Versuch gab es vier Durchläufe.

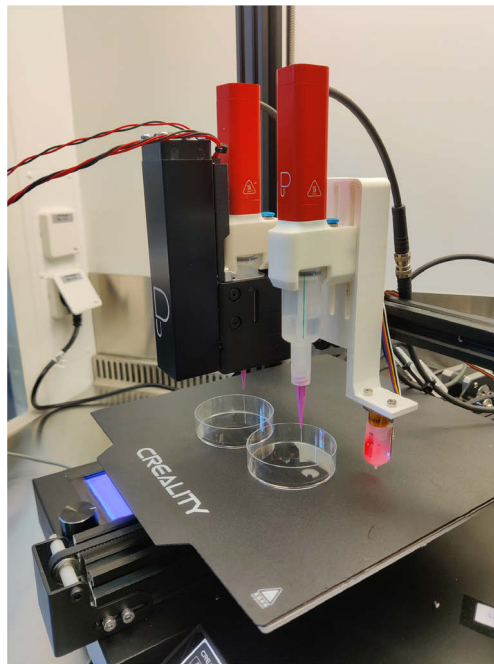


Abbildung 40: Parallele Anordnung der zwei Druckköpfe im 3D-Drucker nebeneinander (mit neuer Halterung für beide Druckköpfe) und ohne Verbindungsstück.

Im zweiten Teil des Versuches wurde dann versucht die beiden Druckköpfe miteinander zu verbinden. Für eine freie Rotation der Kartuschen zueinander wurde zuerst via Luer-Lock an jeder Kartusche ein Luer-Lock Adapter männlich/weiblich, welcher drehbar war, angebracht (Luer-Lock-77D, Vieweg GmbH, Kranzberg, Deutschland). An die jeweils männlichen Anschlüsse folgte dann das selbst entworfene Y-Verbindungsstück, in welchem die Durchmischung der Komponenten während des Druckes, erfolgen sollte. Als Dosiernadel diente die Mikro-Präzisions-Dosiernadel (Super Micro Dosiernadel, Vieweg GmbH, Kranzberg, Deutschland) mit 0,44 mm Durchmesser.

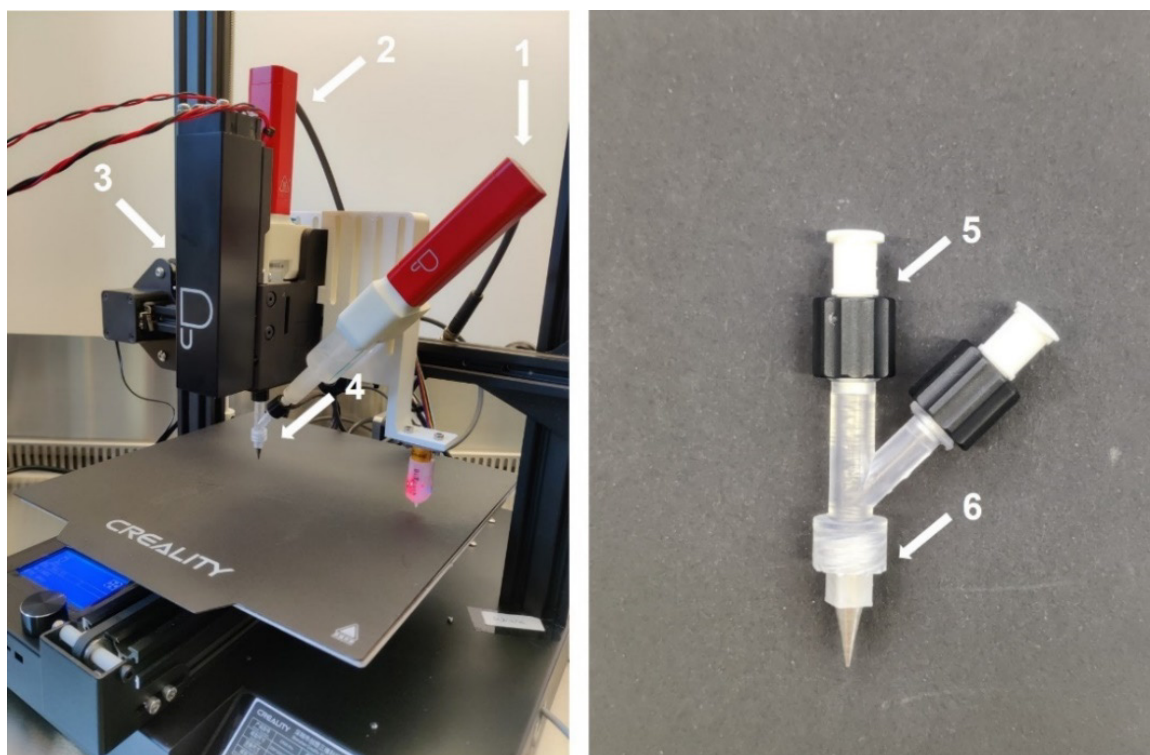


Abbildung 41: Prinzip Zweikomponentendruck mit 1) Druckkopf-1, 2) Druckkopf-2, 3) Temperiereinheit, 4) Y-Verbindungsstück, 5) Luer-Lock Adapter drehbar und 6) Dosiernadel mit 0,44 mm-Innendurchmesser.

Wie Abbildung 42 zeigt, wurde in die Kartusche, welche temperiert werden konnte, die Gelatine-Lösung mit der Basen-Lösung, in dem Fall TEOA 6 % oder K_2HPO_4 10 % gefüllt (gesamt 1700 μ l) und in die andere Kartusche die Oligomer-Lösung von oSMoMA-3,5 (100 μ l). Analog zu oben wurde das Druckverhältnis von 17:1 eingestellt und der Druck gestartet. In zeitlicher Reihenfolge wurden Bilder des Y-Verbindungsstücks mit Inhalt aufgenommen.

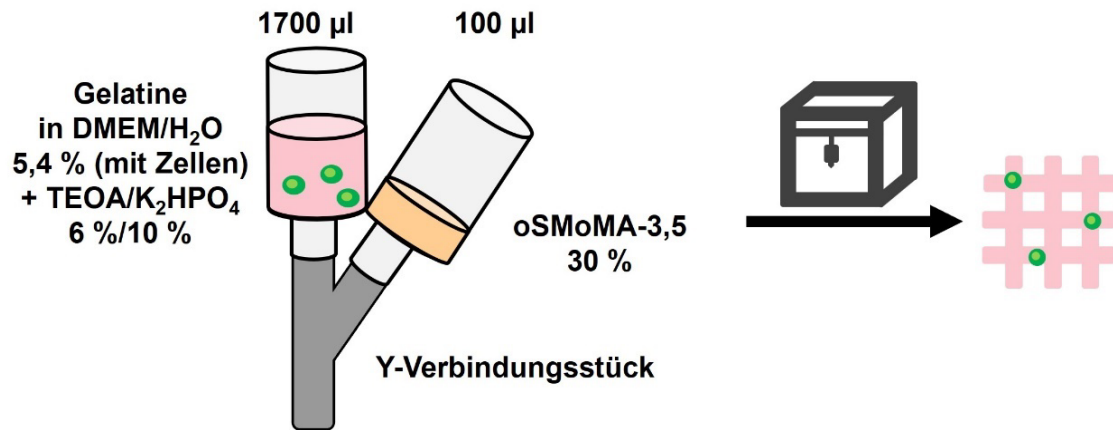


Abbildung 42: Schemazeichnung des Zweikomponentendrucks mit Y-Verbindungsstück und ausführlicher Beschreibung zur Befüllung der zwei Kartuschen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Charakterisierung des Oligomers

Die Analytik der Oligomere mit Hilfe der ^1H -NMR, der Gelpermeationschromatographie (GPC) und den Titrationen (konduktometrische Titration und Brown-Fujimori-Titration) diente dazu die verschiedenen Typen an oSMoMA-x zu unterscheiden und zu charakterisieren. Unter anderem ist der MA-Gehalt von entscheidender Bedeutung für die Quervernetzungsreaktion zwischen Oligomer und natürlichem Biopolymer. In Abbildung 43a sieht man generell beim Vergleich von oSMoMA-2 und oSMoMA-10 den steigenden Gehalt an MA durch die stärkere Gelbfärbung des Pulvers. Abbildung 43b verdeutlicht dabei die Gelbfärbung noch einmal. Dort ist jedes Oligomer (in aufsteigender Reihenfolge) in einer 30%igen Lösung in DMSO dargestellt. Das bedeutet, dass es bei der Erhöhung des MA-Gehaltes zu einer erhöhten Anzahl an konjugierten Doppelbindungen kommt, die die Farbigkeit erhöhen [51].

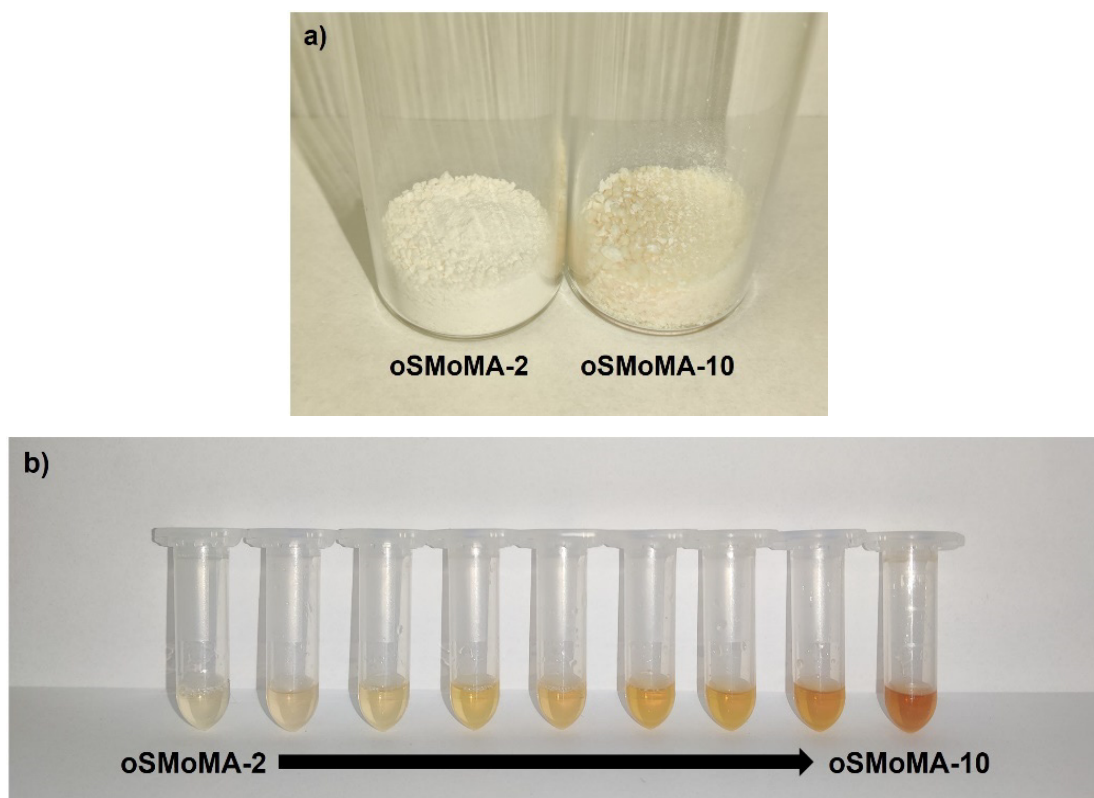


Abbildung 43: Unterschiedliche Färbung der Oligomere durch verschiedene MA-Gehalte mit a) als reines Pulver nach der Synthese und b) als 30%ige Lösung in DMSO.

4.1.1 ^1H -NMR-Untersuchungen

Das ^1H -NMR wurde durchgeführt, um das Verhältnis von eingebauten Comonomeren in Bezug auf ein Molekül oder Mol Stearylacrylat (SA) zu bestimmen (Abbildung 44). Dazu wurde das Integral I_2 , welches zwei Arten der Methylengruppen von Stearylacrylat darstellt (b, c), zum Normalisieren für alle anderen Integrale genutzt. Das Resultat der Integration konnte mit dem Integral I_1 , welches die endständige Methylgruppe (a) darstellt, überprüft werden und sollte etwa einen Wert von 3 Protonen besitzen. Da im Integral I_4 zusätzlich zu AMo (q, p) auch Protonen von MA (j) und SA (e) zu finden sind, wurde für die Auswertung der Anzahl an AMo-Bestandteilen das vordere Integral I_3 genutzt.

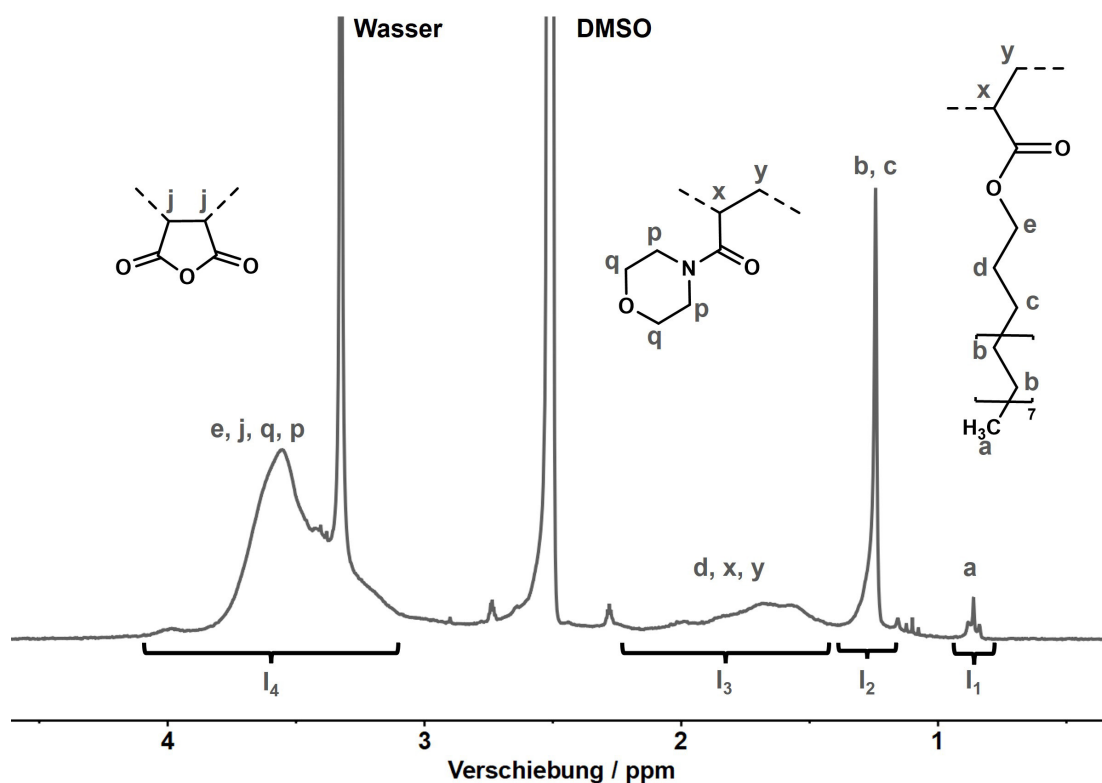


Abbildung 44: ^1H -NMR am Beispiel von oSMoMA-5. I_1 bis I_4 stellen die Integrale dar, die für die Bestimmung der Anzahl an Comonomeren von Bedeutung sind. Die Buchstaben an den Integralen entsprechen den Protonen der dargestellten Strukturelemente des oSMoMA-x.

Das Verhältnis von AMo zu MA konnte nicht allein durch die Auswertung des ^1H -NMRs bestimmt werden, da alle Integrale, die für MA verwendet werden könnten, miteinander überlappen. Dazu wurden die Ergebnisse der konduktometrischen Titration (Kapitel 4.1.3) mit in die Berechnung einbezogen. In Abbildung 45 ist gut ersichtlich, dass mit steigendem MA-Anteil auch der Gehalt an MA steigt. Ebenfalls steigt, wie gewünscht, das Verhältnis von MA zu AMo. Optimalerweise sollte das

Verhältnis beispielsweise bei oSMoMA-10 1:1 betragen, da gleich viele Anteile an MA und AMo (10) enthalten sein sollten. Dies beruht auf der Annahme, dass die Anzahl an Comonomeren (Summe von MA und AMo) in jedem oSMoMA-x 20 beträgt. Aus diesem Grund müsste die Anzahl an AMo mit steigendem Anteil an MA sinken. Dies ist hier nicht der Fall und erklärt auch den niedrigeren Wert beim Verhältnis MA zu AMo im Gegensatz zum erwarteten Wert. Ein Grund für den erhöhten Einbau von AMo könnte sein, dass die Doppelbindung im AMo im Vergleich zu der Doppelbindung im MA für die radikalische Polymerisation besser zugänglich ist. AMo weist zum Beispiel auch bei anderen Anwendungen, wie der UV-Härtung, aufgrund seiner Struktur und physikalischen Eigenschaften eine hohe Reaktivität bei radikalischen Polymerisationen auf [52]. Im Gegensatz zu AMo besitzt MA in der Nähe der Doppelbindung eine elektronenziehende Carbonylgruppe, die die Elektronendichte an der Doppelbindung verringert und so die Reaktivität gegenüber Radikalen senkt. Die elektronenarme Doppelbindung kann aber beispielsweise gut für Reaktionen mit Nukleophilen genutzt werden. Zudem kann die Annäherung an die Doppelbindung durch die zyklische Struktur erschwert sein [53].

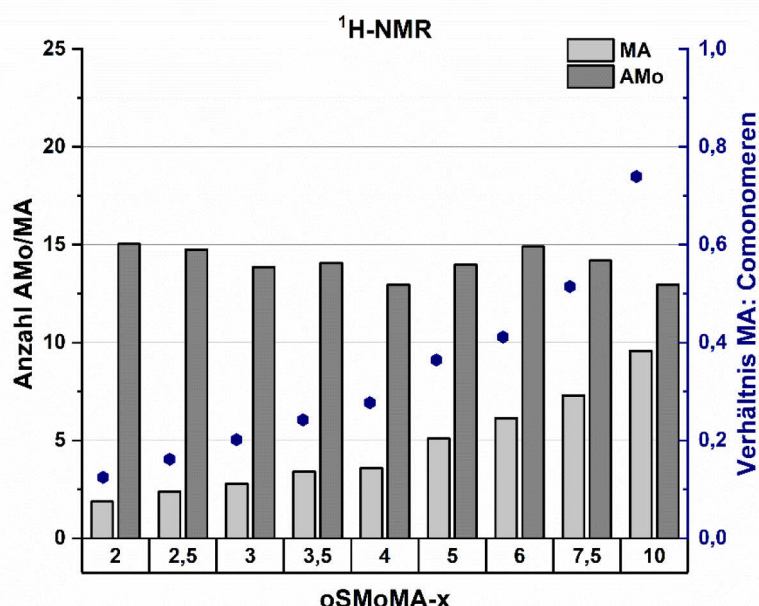


Abbildung 45: Darstellung der Anzahl an AMo bzw. MA und dem Verhältnis der beiden Comonomere zueinander. Die Bestimmung erfolgte mit dem $^1\text{H-NMR}$ und unter Zunahme der konduktometrischen Ergebnisse.

Die gestapelten Spektren (Abbildung 46) zeigen den Vergleich von drei verschiedenen Oligomeren. Dabei wurde das synthetisierte Oligomer mit dem niedrigsten MA-Gehalt (oSMoMA-2, rot), das mit dem höchsten MA-Gehalt (oSMoMA-10, blau) und eines dazwischen (oSMoMA-5, grün) ausgewählt. Es ist deutlich zu erkennen, dass beide Integrale I_3 und I_4 mit höherem MA-Gehalt kleiner werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Anteil an AMo mit steigendem MA-Gehalt sinkt und die AMo-Protonen in den beiden Integralen den größeren Anteil ausmachen.

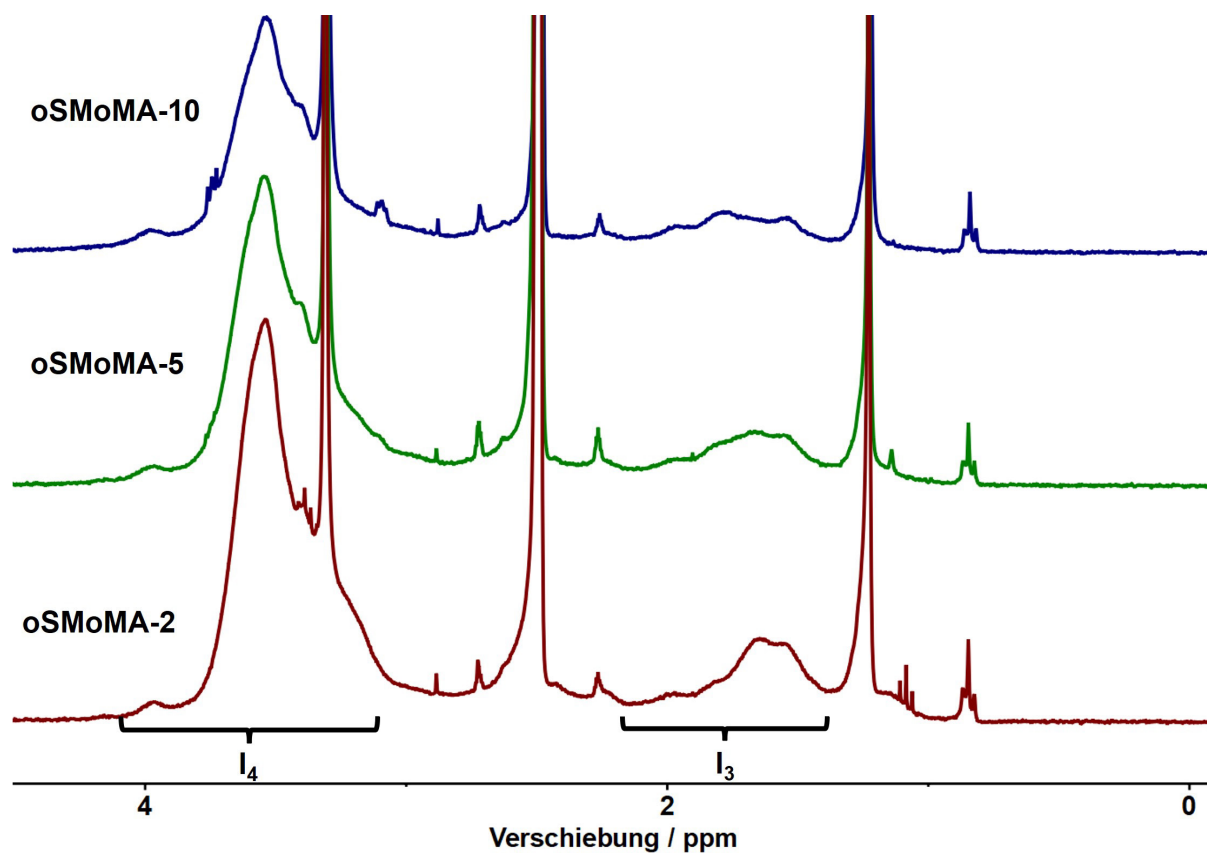


Abbildung 46: Gestapelte ^1H -NMR-Spektren für oSMoMA-x mit oSMoMA-2 (rot), oSMoMA-5 (grün) und oSMoMA-10 (blau).

4.1.2 Molekulargewichtsbestimmung mittels GPC

Um das Molekulargewicht zu bestimmen, wurde eine GPC durchgeführt. Dargestellt ist hier das zahlenmittlere Molekulargewicht (M_n) und die Dispersität (Abbildung 47).

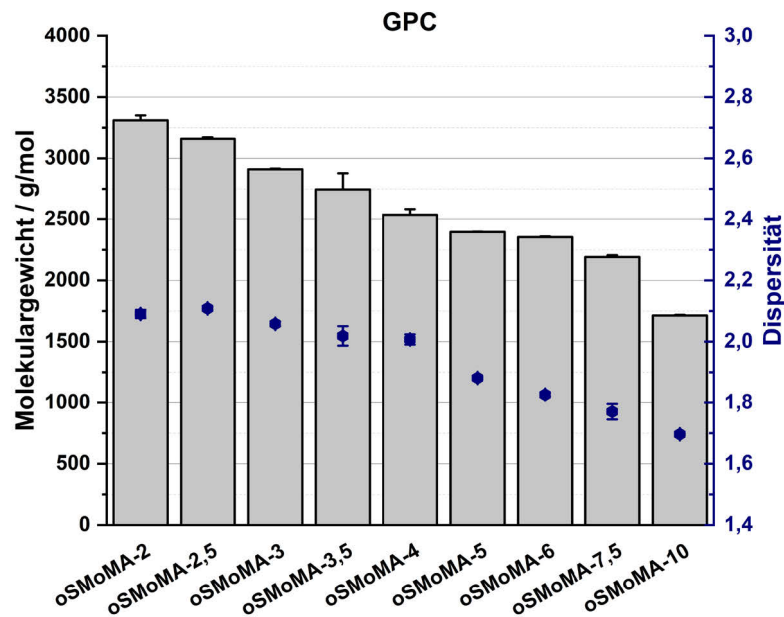


Abbildung 47: Ergebnisse der GPC mit dem zahlenmittleren Molekulargewicht (M_n) und der Dispersität ($n=3$, $MW \pm SD$).

Alle Oligomere weisen ein Molekulargewicht von unter 3500 g/mol auf. Für die Verwendung des Oligomers als Quervernetzer mit dem natürlichem Biopolymer ist es entscheidend, dass das Molekulargewicht unter einer Größe von 60 kDa (60.000 g/mol) bleibt, um den Grenzwert für die glomeruläre Filtration bzw. die renale Elimination nicht zu überschreiten [54]. Mit steigendem MA-Gehalt sinkt das Molekulargewicht. Das ist auf die Molekulargewichte der einzelnen Bestandteile von oSMoMA-x zurückzuführen. Mit steigendem Anteil von MA sinkt, bei einem konstanten Verhältnis der Comonomere von 1:20, der Anteil an AMo. Da AMo im Vergleich zu MA das höhere Molekulargewicht hat, sinkt das gesamte Molekulargewicht bei niedrigerem Anteil an AMo. Die Dispersität beschreibt ein dimensionsloses Verhältnis aus dem zahlenmittleren Molekulargewicht (M_n) und dem gewichtsmittleren Molekulargewicht (M_w). Sie charakterisiert die Streuung der Verteilung um die Molmassen. Bei Werten um 1 liegt eine enge Verteilung vor, bei Dispersitäten über 1 eine größere Molekülvielfalt. [55]. Das Erreichen einer

Dispersität von 1 würde für die Gleichförmigkeit der Polymerketten sprechen und Monodispersität aufzeigen. Dies stellt jedoch eine große Herausforderung bei der Polymersynthese dar und wurde bisher selten erreicht. Aus diesem Grund werden für das Zeichnen eines kontrollierten Charakters der Polymerisation, Dispersitäten im Bereich von 1,01 bis 1,20 angestrebt [56]. Die Dispersität sinkt in diesem Fall mit steigendem MA-Gehalt, sodass die Vielfalt an Molekülen in der Molmassenverteilung abnimmt.

4.1.3 Titration

Die frisch synthetisierten Oligomere sind durch ihre eingebauten MA-Einheiten reaktiv. Da es durch die Aufreinigung oder Lagerung der Oligomere zu einer feuchtigkeitsbedingten Hydrolyse der Anhydride zu Carbonsäuren kommen kann [57], wodurch diese an Reaktivität verlieren, wurden zur Überprüfung der Anhydride die konduktometrische Titration und die Brown-Fujimori-Titration [58] durchgeführt. Die konduktometrische Titration bestimmte das Ausmaß der eingebauten MA-Einheiten im Oligomer (reaktiv und nicht-reaktiv), wohingegen die Brown-Fujimori-Titration die Intaktheit analysierte.

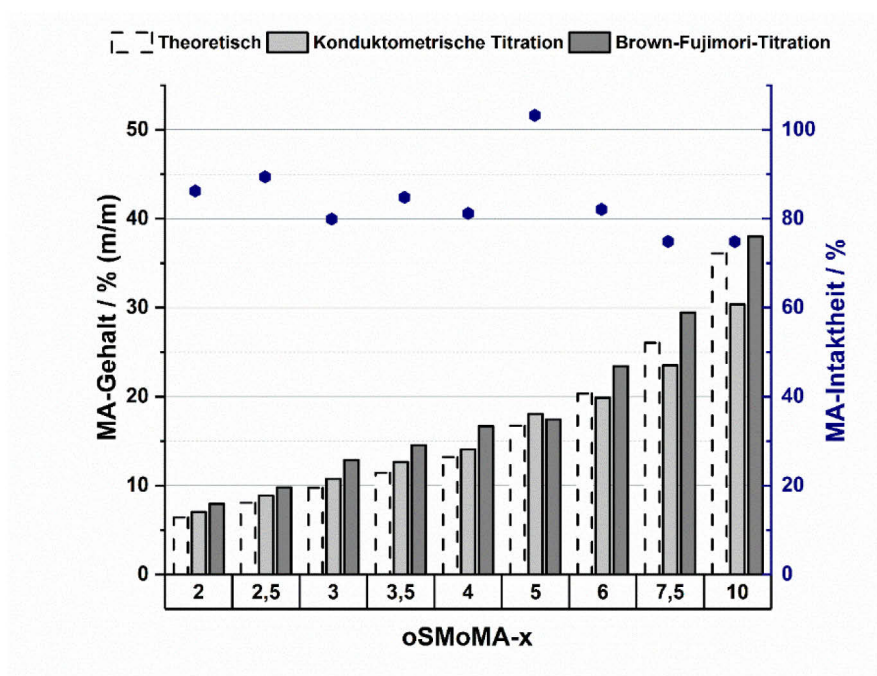


Abbildung 48: Bestimmung des MA-Gehaltes (% m/m) und der MA-Intaktheit (%) aller Oligomere mit der konduktometrischen Titration und der Brown-Fujimori-Titration. Alle Titrations wurden dreifach durchgeführt ($n=3$) und die Mittelwerte zur Berechnung in Formel 1 eingesetzt. Aus diesem Grund sind keine Standardabweichungen angegeben.

Mit steigendem theoretischen MA-Gehalt sieht man auch einen steigenden MA-Gehalt in den Ergebnissen der konduktometrischen- und der Brown-Fujimori-Titration, sodass man sagen konnte, dass ein zunehmender Einbau von MA-Einheiten mit steigendem MA-Gehalt erfolgreich war (Abbildung 48). Zudem liegt die MA-Intaktheit bei allen Oligomeren bei über 75 %, sodass von einer guten Reaktivität der Oligomere ausgegangen werden kann. Ähnliche Werte wurden in der Literatur auch für andere Oligomere der Arbeitsgruppe gefunden. Kascholke *et al.* erreichten für verschiedene Typen des Oligomers oPDMA eine MA-Intaktheit von 68,0 % bis 71,5 % [47] und Kohn *et al.* für verschiedene Typen des Oligomers oPNMA eine MA-Intaktheit von 66 % bis 77 % [48]. Die hier aufgezeigte MA-Intaktheit des Oligomers oSMoMA-x übersteigt damit sogar die MA-Intaktheit der vorherigen Oligomere.

4.1.4 Korrelation: Molekulargewicht und Anzahl an Comonomeren

Für diesen Versuchtsteil wird angenommen, dass die Anzahl an Comonomeren (Summe aus MA und AMo) bei insgesamt 20 liegt. Da AMo im Vergleich zu MA ein deutlich höheres Molekulargewicht zeigt, wird für die lineare Funktion der steigenden Anzahl an MA-Einheiten für das Molekulargewicht eine negative Steigung und für die steigende Anzahl an AMo-Einheiten für das Molekulargewicht eine positive Steigung erhalten. Dabei wurde jeweils die experimentell bestimmte Anzahl an MA oder AMo mit dem Ergebnis des Molekulargewichtes aus der GPC korreliert und mit den theoretischen Berechnungen verglichen. Korreliert man die theoretische Anzahl an MA oder AMo mit dem berechneten Molekulargewicht, sollte eine Linearität mit einem Bestimmtheitsmaß (R^2) von 1 herauskommen. Für die praktisch bestimmten Werte von MA ergibt sich ein Bestimmtheitsmaß von 0,9569, was zeigt, dass der erhöhte Einbau an MA-Einheiten, von oSMoMA-2 zu oSMoMA-10 hin, erfolgreich war (Abbildung 49). Vergleicht man die beiden Steigungen der Graphen miteinander, wird deutlich, dass die Steigung der linearen Funktion für die praktisch bestimmten Werte (Steigung von -259,54) stärker ist als bei der linearen Funktion für die theoretischen Werte (Steigung von -43,11). Für die synthetisierten Oligomere bedeutet dies, dass der Einfluss der Anzahl an MA-Einheiten auf das Molekulargewicht, welches mit der GPC bestimmt worden ist, höher ist als in der theoretischen Berechnung angenommen wird.

Mit erhöhter Anzahl an MA-Einheiten sinkt das Molekulargewicht deutlich stärker als die theoretische Berechnung es zeigt.

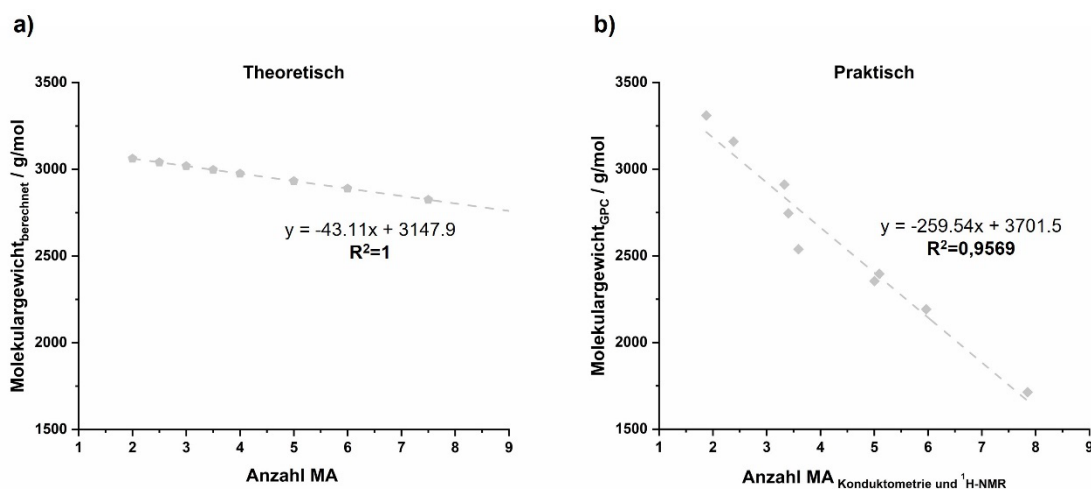


Abbildung 49: Korrelation zwischen a) dem berechneten Molekulargewicht und der theoretischen Anzahl an MA und b) zwischen dem bestimmten Molekulargewicht aus der GPC und der Anzahl an MA aus der Konduktometrie und dem ¹H-NMR.

Für die praktisch bestimmten Werte von AMo hingegen zeigt sich ein geringes Bestimmtheitsmaß von 0,3591 (Abbildung 50). Vergleicht man hier die beiden Steigungen miteinander wird deutlich, dass die lineare Funktion der praktisch bestimmten Werte für das AMo eine deutlich stärkere Steigung (Steigung von 391,87) und damit eine deutlich stärkere Erhöhung des Molekulargewichtes mit erhöhter Anzahl an AMo-Einheiten, im Vergleich zu der Berechnung (Steigung von 43,11), zeigt. Gewünscht wäre hier eine steigende Anzahl an AMo-Einheiten mit weniger stark steigendem Molekulargewicht. Idealerweise würden die Steigungen der praktisch bestimmten Werte für MA und AMo denselben Wert lediglich mit unterschiedlichem Vorzeichen zeigen. Das würde auch bedeuten, dass die Summe von Comonomeren für ein bestimmtes Molekulargewicht genau 20 betragen würde. Die Ergebnisse hier spiegeln auch die Ergebnisse aus dem ¹H-NMR wider und zeigen, dass der Einbau von AMo in der Synthese nicht so erfolgreich war, wie erwünscht. Unabhängig von der gewünschten Anzahl an AMo finden sich in jedem Oligomer etwa 13-15 Einheiten an AMo wieder. Wie D'Agosto *et al.* auch schon zeigten, besitzt AMo eine hohe Tendenz zur Homopolymerisation [59]. Dies könnte eine Erklärung für den nicht erfolgreichen Einbau von AMo-Einheiten während der Synthese sein.

Ab einer bestimmten Anzahl an AMo-Einheiten könnte die weitere Erhöhung der AMo-Konzentration nicht mehr zu einem erhöhten Einbau in oSMoMA-x führen, da überschüssiges AMo mit sich selbst polymerisiert und für den weiteren Einbau in oSMoMA-x somit nicht mehr zur Verfügung steht.

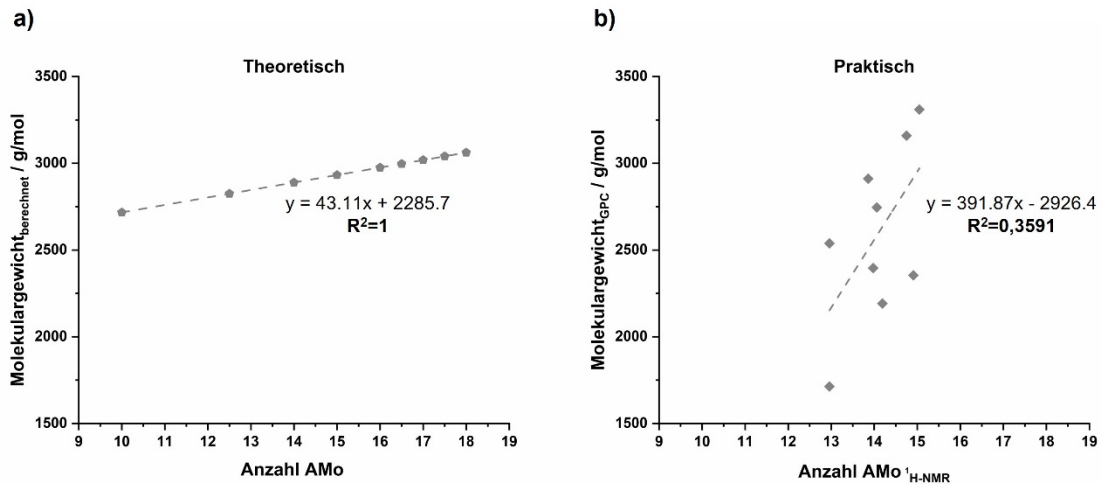


Abbildung 50: Korrelation zwischen a) dem berechneten Molekulargewicht und der theoretischen Anzahl an AMo und b) zwischen dem bestimmten Molekulargewicht aus der GPC und der Anzahl an AMo aus dem ¹H-NMR.

4.2 Zusätzliche Aktivierung des Oligomers

Wie in den Methoden beschrieben, konnten die Anhydride des Oligomers oSMoMA-x durch eine Lagerung bei 130 °C (24 h) zusätzlich aktiviert werden. Am Beispiel von oSMoMA-3 wurden jeweils vor und nach der Aktivierung verschiedene Charakterisierungsmethoden durchgeführt. Das Oligomer vor der Aktivierung wird dabei als „nicht-aktiviertes“ Oligomer bezeichnet.

4.2.1 Gelierungskinetik

Bei der Gelierungskinetik zeigten sich bei dem Speichermodul (G') bei der gesamten Kurve und auch bei dem Wert von 1000 Sekunden deutliche Unterschiede zwischen dem nicht-aktivierten und dem aktivierten Oligomer (Abbildung 51). Das aktivierte Oligomer zeigt deutlich erhöhte Werte im Gegensatz zum nicht-aktivierten Oligomer. Das ist auf die Anhydride zurückzuführen, die nach dem zusätzlichen Aktivieren wieder für die Reaktionen mit den Aminen der natürlichen Biopolymere zur Verfügung stehen und so zu einer erhöhten Festigkeit des Hydrogels durch vermehrte Quervernetzungsreaktion führen können.

Zuvor lagen die Anhydride als hydrolysierte Carbonsäuren vor, die keine Amin-Anhydrid-Konjugation für die Quervernetzung eingehen konnten.

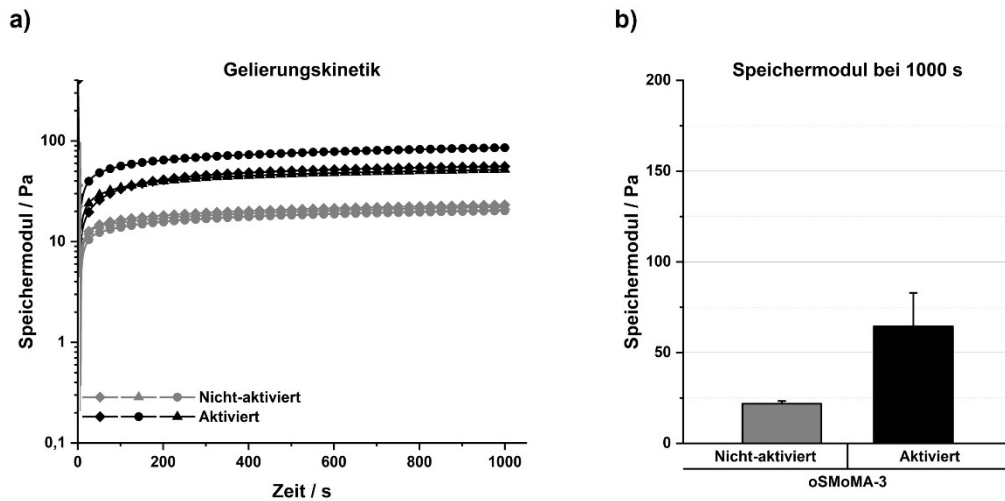


Abbildung 51: Vergleich a) der Gelierungskinetik und b) des Speichermoduls (G') bei 1000 Sekunden zwischen dem nicht-aktivierten und dem aktivierten oSMoMA-3 ($n=3$, $MW \pm SD$).

4.2.2 Titration

Bei den Ergebnissen der Titrationsen zeigten sich, wie zu erwarten, Unterschiede bei der Intaktheit der Anhydride (Abbildung 52).

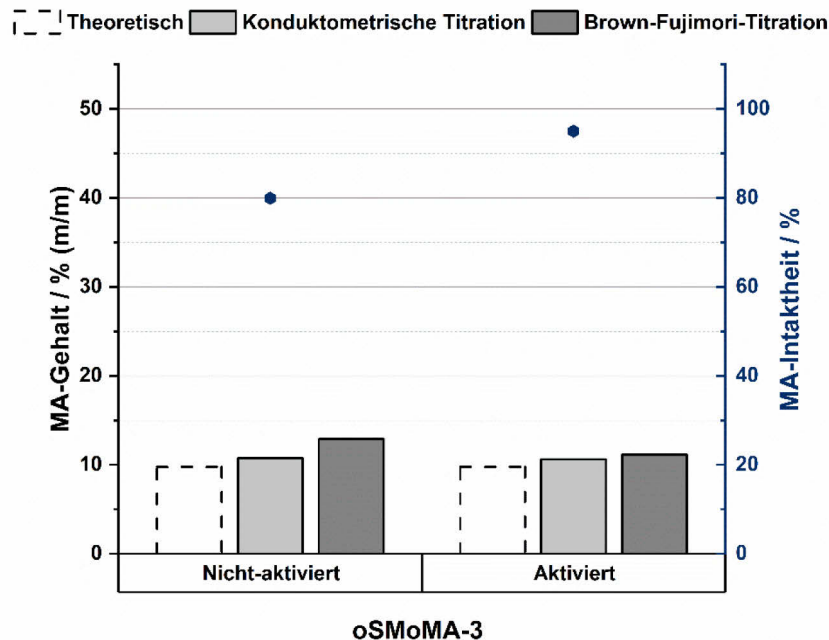


Abbildung 52: Bestimmung des MA-Gehaltes (% m/m) und der MA-Intaktheit (%) von dem nicht-aktivierten und dem aktivierten oSMoMA-3 mit der konduktometrischen Titration und der Brown-Fujimori-Titration. Alle Titrationsen wurden dreifach durchgeführt ($n=3$) und die Mittelwerte zur Berechnung in Formel 1 eingesetzt. Aus diesem Grund sind keine Standardabweichungen angegeben.

Der Wert konnte durch die zusätzliche Aktivierung von etwa 80 % auf eine Intaktheit von über 90 % angehoben werden. Leichte Unterschiede in den MA-Gehalten, vor allem bei der BFT-Titration, ergaben sich durch die Sensitivität der Ergebnisse auf Variationen bei der Durchführung der BFT-Titration.

4.2.3 ^1H -NMR und GPC

Bei der Auswertung des ^1H -NMRs und der GPC ergaben sich keine Unterschiede zwischen dem nicht-aktivierten und dem aktivierten Oligomer. Durch die zusätzliche Aktivierung ändert sich die ursprüngliche chemische Zusammensetzung der Oligomere nicht. Das Oligomer behält dieselbe chemische Zusammensetzung und ein vergleichbares Molekulargewicht, wie vor der zusätzlichen Aktivierung. Dies zeigen so auch die Ergebnisse in Abbildung 53.

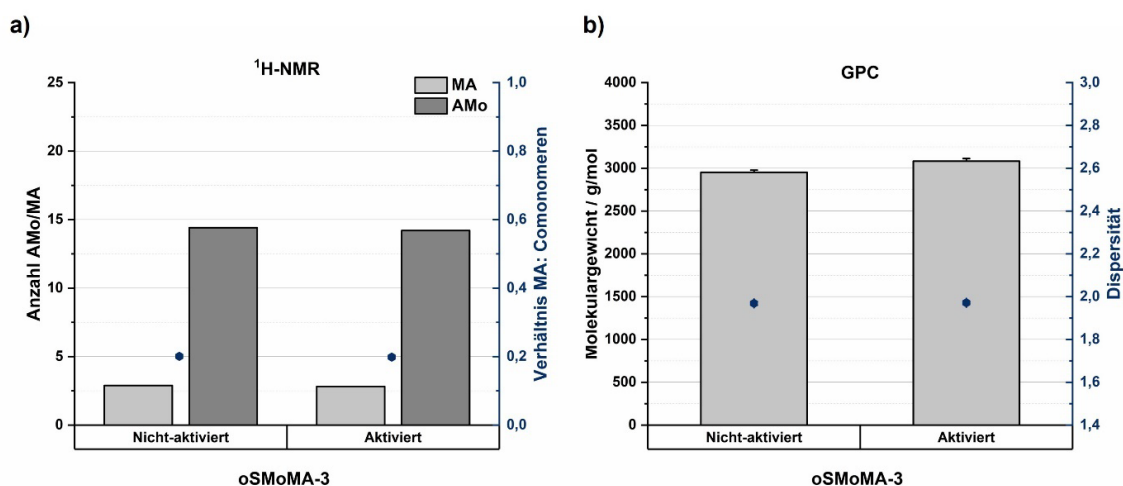


Abbildung 53: Vergleich des nicht-aktivierten und des aktivierten osMoMA-3 mit a) Darstellung der Anzahl an AMo bzw. MA und dem Verhältnis der beiden Comonomere zueinander. Die Bestimmung erfolgte mit dem ^1H -NMR und unter Zunahme der konduktometrischen Ergebnisse; und b) Ergebnisse der GPC mit dem zahlenmittleren Molekulargewicht (M_n) und der Dispersität ($n=3$, $MW \pm SD$).

4.3 Gelherstellung und Charakterisierung der Hydrogele mit verschiedenen natürlichen Biopolymeren

Für die drei natürlichen Biopolymeren, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden jeweils spezifische Methoden für die Hydrogel-Herstellung gefunden und angewandt. Bei der Quervernetzungsreaktion handelt es sich hierbei um eine kovalente Amin-Anhydrid-Konjugation [60]. Wie bereits Abbildung 7 in der Einleitung zeigt, ist die Kombination aus dem natürlichen Biopolymer (Gelatine, Imager[®] oder Chitosan), welches das Amin für die Reaktion liefert, und dem Oligomer (oSMoMA-x), welches das Anhydrid für die Reaktion liefert, von Bedeutung. Bei jeder Herstellungsmethode, unabhängig von dem natürlichen Biopolymer, war zudem eine Base anwesend, um als Protonenfänger während der Reaktion zu dienen [21]. Aufgrund der unterschiedlichen Komponenten, die für jedes natürliche Biopolymer verwendet wurden, ergaben sich Hydrogele mit unterschiedlichem visuellem Aussehen und unterschiedlichen Eigenschaften. In Abbildung 54 sieht man Beispiele von den drei verschiedenen Hydrogelen mit a) Gelatine, b) Imager[®] oder c) Chitosan), welche in einem Eppendorf-Gefäß im Maßstab von 180 µl hergestellt worden sind und anschließend für die Aufnahme aus dem Gefäß entfernt wurden.

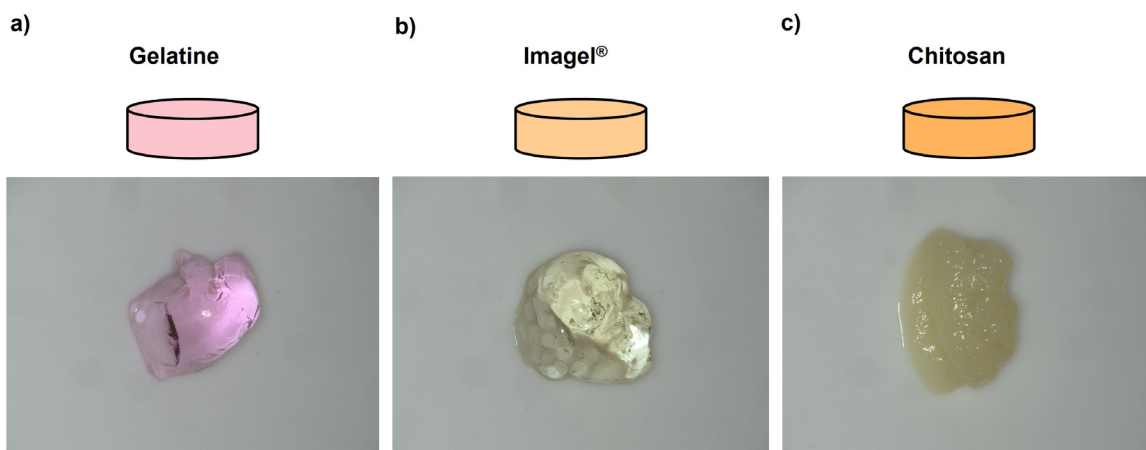


Abbildung 54: Darstellung und Aufnahme des Hydrogels mit a) Gelatine, b) Imager[®] oder c) Chitosan als natürliches Biopolymer. Hergestellt wurden die Hydrogele basierend auf Tabelle 5 mit Anpassung der Volumina auf 180 µl.

Im Gegensatz zu den Imager[®]-Hydrogelen enthalten die Gelatine- und Chitosan-Hydrogele DMEM mit Phenolrot als Nährmedium. Bei Phenolrot handelt es sich um einen Farbindikator, der oft Kulturmedien zugesetzt wird. Bei neutralem pH-Wert von 7,4 zeigt Phenolrot im Kulturmedium eine charakteristische kirschrote Farbe, sinkt der pH-Wert durch verschiedene Einflüsse ab ($< 7,2$), ändert sich die Farbe im Kulturmedium nach Orange bis Gelb [61]. Aus diesem Grund zeigt sich das Gelatine-Hydrogel hier auch in der kirschroten Farbe. Beim Chitosan-Hydrogel ist keine kirschrote Farbe ersichtlich, da der pH-Wert durch die Zugabe von HCl deutlich im sauren Bereich liegt, wo das Phenolrot des DMEMs eine gelbliche Farbe zeigt. Im Imager[®]-Hydrogel sind keine pH-abhängigen Farbstoffe enthalten und die Farbe wird lediglich von den Komponenten selbst bestimmt. Betrachtet man die Hydrogele, welche im Maßstab von 450 μl im Schnappdeckelglas hergestellt wurden (Abbildung 55), werden auch die unterschiedlichen Strukturen der Hydrogele sichtbar. Die untere Reihe in Abbildung 55 zeigt Aufnahmen am Keyence Digitalmikroskop. Das homogenste Hydrogel, aufgrund der glatten Struktur, bildet hier das Imager[®] mit zugehörigen Komponenten. Am wenigsten homogen erscheint, durch viele Unebenheiten, das Chitosan-Hydrogel. Bei dem Gelatine-Hydrogel ist durch die Reflexion des Lichtes zudem eine erhöhte Wassereinlagerung erkennbar.

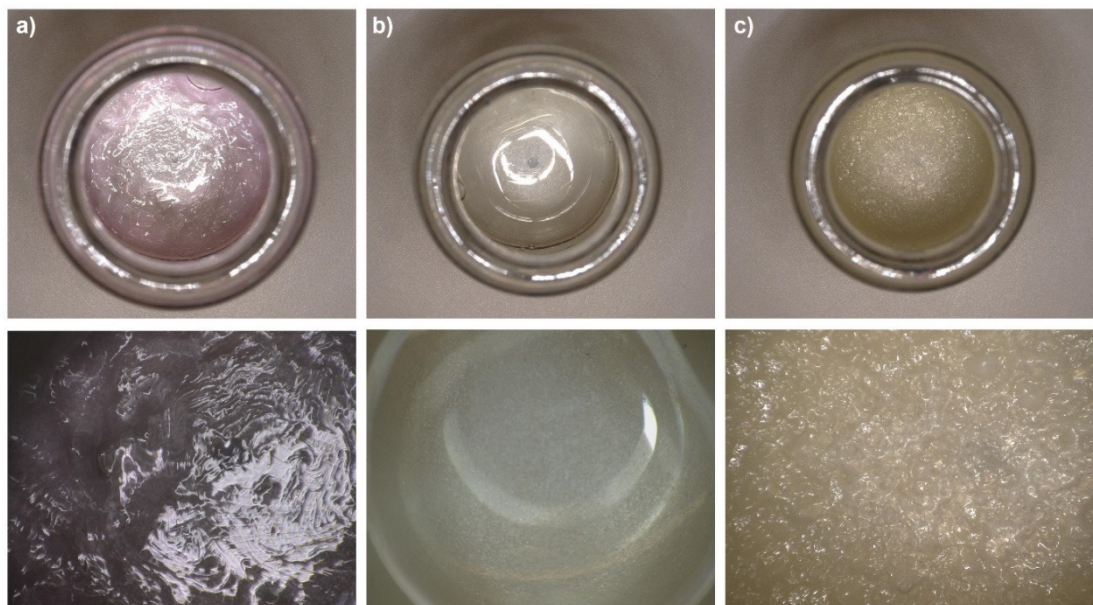


Abbildung 55: Mikroskopische Aufnahmen am Keyence Digitalmikroskop des Hydrogels mit a) Gelatine, b) Imager[®] oder c) Chitosan als natürliches Biopolymer am Keyence Digitalmikroskop. Hergestellt wurden die Hydrogele basierend auf Tabelle 5 mit Anpassung der Volumina auf 450 μl .

Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Hydrogelen zeigen sich besonders deutlich in der Gelierungskinetik während des zeitabhängigen Oszillationstests über 1000 Sekunden. Dafür wurden jeweils die drei Hydrogele mit den besten Eigenschaften miteinander verglichen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Zusammensetzungen der Hydrogele für jedes natürliches Biopolymer mit den vielversprechendsten Eigenschaften.

Eigenschaft	Gelatine	Imagel®	Chitosan
Lösung natürliches Biopolymer	5,4 % in DMEM/H ₂ O	37,5 % in H ₂ O	3,30 % in 0,05 M HCl
Lösung Base	TEOA 6 %	NMPO 1740 mM	β-GP 0,5 %
Art Oligomer	oSMoMA-3,5	oSMoMA-7,5	oSMoMA-4
Lösung Oligomer	30 % in DMSO	7 % in DMSO	40 % in DMSO:PG (7:3)
Verhältnis [µl]	55:30:5 Gel.:Base: Oligomer	45:45 Premix:Oligomer	80:8 Chitosan: Oligomer

Die Beurteilung der Eigenschaften der Hydrogele, mit unterschiedlichen natürlichen Biopolymeren, erfolgte anhand der verschiedenen Charakterisierungsmethoden. In Tabelle 6 ist dargestellt, wie das jeweilige Ergebnis der Methode zu deuten ist. Das Ziel ist eine erhöhte Festigkeit und Stabilität des Hydrogels, eingehend mit einer erhöhten Überlebensrate der eingebetteten Zellen.

Tabelle 6: Charakterisierungsmethoden für die verschiedenen Hydrogele und die resultierenden Ergebnisse mit dazugehörigem Effekt auf die Eigenschaften des Hydrogels.

Methode	Ergebnis	Effekt
Gelierungskinetik/ Speichermodul (G') bei 1000 s [Pa]	Höherer Speichermodul (G')	Höhere Festigkeit des Hydrogels direkt nach der Herstellung
Frequenztest der Hydrogel-Platten [Pa]	Höherer Speichermodul (G')	Höhere Festigkeit des Hydrogels nach definierten Wasch- und Trocknungsschritten
Trockengewicht [mg]	Höheres Gewicht	Höhere Stabilität des Hydrogels nach definierten Wasch- und Trocknungsschritten
Herauslösbare Anteile [%]	Geringere prozentuale Anteile	Höhere Stabilität des Hydrogels nach definierten Wasch- und Trocknungsschritten
Wassergehalt [%]	Höherer prozentualer Wert	Bessere Nachahmung des Gewebes durch höheren Wassergehalt [62]
Quervernetzungsrad (TNBS-Assay) [%]	Höherer prozentualer Grad	Höhere Stabilität durch höheren Anteil an Quervernetzung
Zellviabilität [/]	Höhere Absorption	Höhere Überlebensrate bzw. Proliferation der Zellen

Die Gelierungskinetik in Abbildung 56 zeigt für alle drei Hydrogele mit unterschiedlicher Zusammensetzung einen Anstieg des Speichermoduls (G') und Verlustmoduls (G'') über die Zeit. Das elastische Verhalten, was für die Hydrogel-Bildung spricht, liegt vor, wenn der Speichermodul (G') über dem Wert des Verlustmoduls (G''), was mit einem Phasenwinkel (P) kleiner 45° korreliert, liegt. Für die Beurteilung der Festigkeit des Hydrogels kann aber lediglich der Speichermodul (G') verwendet werden [63].

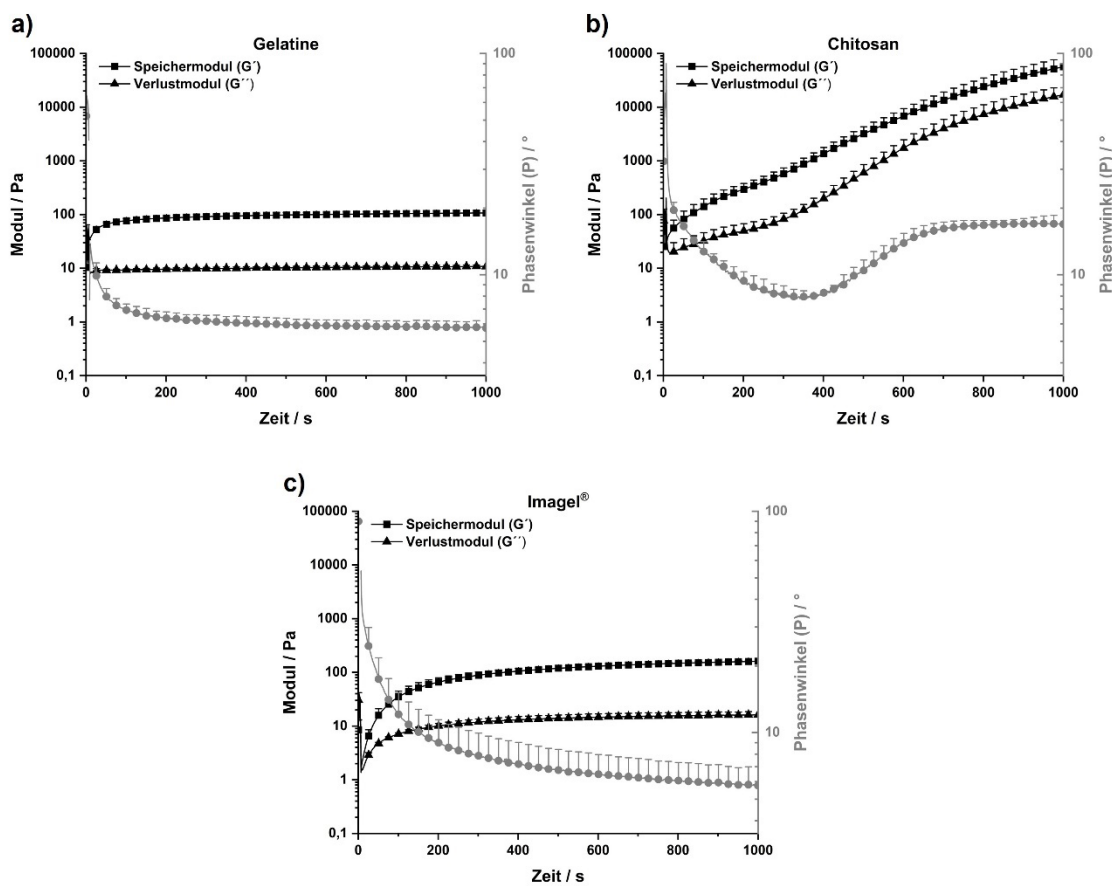


Abbildung 56: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik für a) das Gelatine-Hydrogel, b) das Imager®-Hydrogel und c) dem Chitosan-Hydrogel aus Tabelle 5 mit dem dazugehörigen Speichermodul (G'), dem Verlustmodul (G'') und dem Phasenwinkel (P) ($n=3$, MW $\pm$ SD).

Im Vergleich zu den Gelatine- und Imager[®]-Hydrogelen ist der Anstieg des Speichermoduls (G') bei den Chitosan-Hydrogelen deutlich höher, was für festere Hydrogele spricht. Zudem ist die Gelierung hier bei 1000 Sekunden noch nicht beendet, während die anderen Hydrogele bereits bei 1000 Sekunden ein Plateau im Speichermodul (G') zeigen. Die Endwerte des Speichermoduls (G') sind bei den Gelatine- und Imager[®]-Hydrogelen annähernd auf einem Niveau, wobei das Imager[®]-Hydrogel eine deutlich langsamere Gelierung zu Beginn zeigt. Der Phasenwinkel (P) bzw. die Phasenverschiebung bleibt bei allen drei Hydrogelen unter dem Wert von 45° , was für den festen gel-artigen Zustand der gemessenen Probe spricht ($45^\circ > P > 0^\circ$). Bei einem Wert zwischen 90° und 45° würde der flüssige fluide Zustand vorliegen, was für eine mangelnde Formstabilität und somit mangelnder Gelierung der Probe sprechen würde [64]. Bei der Betrachtung der Werte für die Speichermodule (G') bei dem Gelatine- und dem Imager[®]-Hydrogel mit etwa 100 Pa und dem Endwert für das Chitosan-Hydrogel mit knapp 100.000 Pa fällt auf, dass die Speichermodule sehr weit auseinander liegen und einen sehr breiten Bereich abdecken. Dies stimmt mit der aktuellen Auswahl an bisher verfügbaren injizierbaren Hydrogelen überein, wie die unten genannten Beispiele zeigen [65-69]. Viele Hydrogele versuchen die komplexe zelluläre Umgebung der EZM, die aus Proteinen, Proteoglykanen und anderen löslichen Molekülen besteht, nachzuahmen, um eine maßgeschneiderte In-vitro-Zellkulturumgebung zu schaffen [70]. Das Matrigel[®] ist ein kommerziell erhältliches Material, das aus der Sekretion von Engelbreth-Holm-Swarm-Maus-Sarkomzellen gewonnen wird [71] und viele wesentliche Bestandteile der EZM, wie zum Beispiel Kollagen oder andere Wachstumsfaktoren enthält [72]. Für das Matrigel[®] werden Speichermodule (G') in dem Bereich von 34 bis 55 Pa beschrieben, was von der Höhe des Speichermoduls zu den Gelatine- bzw. Imager[®]-Hydrogelen passt [65]. Die Mischung aus Matrigel[®] und verschiedenen Anteilen einer Agarose-Lösung wiederum erreicht Speichermodule (G') von 1000 bis 4000 Pa [66]. Das bedeutet, dass Kombinationen aus verschiedenen Komponenten zu einer deutlichen Erhöhung der Festigkeit des Hydrogels führen können.

Im Gegensatz zu dem reinen Matrigel[®], was zwar die notwendigen Wachstumsfaktoren und Peptide enthält, die das Zellwachstum fördert, aber schlechte mechanische Eigenschaften besitzt, führt die oben genannte Mischung zu Hydrogelen mit besseren mechanischen Eigenschaften, die für die Verwendung einer Biotinte von Bedeutung sind [66]. Den Bereich zwischen dem Matrigel[®] und der Mischung aus Matrigel[®] und Agarose konnten Geisler und Schneider mit der Entwicklung einer neuen Klasse einfacher, linearer, amphiphiler Peptide, die sich zu selbsttragenden Hydrogelen zusammenfügen und Speichermodule (G') von 20 bis 800 Pa erreichen können, abdecken [67]. Ebenso fällt die kommerzielle physikalische Verknüpfung aus Matrigel[®] vernetzt mit Chitosan, die als Gerüst für die Knorpelreparatur untersucht wird, mit 1780 Pa in den Bereich dazwischen [68]. Deutlich höhere Speichermodule (G') können zum Beispiel unter Verwendung von Block- und Sterncopolymeren mit achtarmigem PEG und endständigen Segmenten von Poly(D-Milchsäure) erreicht werden. Dort liegt der Speichermodul (G') bei bis zu 14 kPa. Das andere Beispiel, das Werte der Chitosan-Hydrogele erreicht, ist mit der Michael-Addition von thiolmodifiziertem Dextran mit vierarmigem PEG-Tetraacrylat. Dort können Speichermodule (G') von 100 kPa erreicht werden [69]. Die Beispiele der Literatur zeigen, dass es je nach Anwendungsgebiet von großem Vorteil sein, eine große Auswahl an Hydrogelen zu haben, die unterschiedliche Festigkeiten aufweisen, wie es bei den drei Hydrogel-Arten hier der Fall ist.

4.4 Vergleich der Hydrogele aus verschiedenen Biopolymeren mit unterschiedlichen Oligomeren

Für den Vergleich der Hydrogele aus drei natürlichen Biopolymeren mit unterschiedlichen Oligomeren wurden die untenstehenden Zusammensetzungen gewählt (Tabelle 7). Bei den Gelatine-Hydrogelen wurden beide möglichen Biotinten aus Kapitel 4.6 verglichen (mit TEOA 6 % und K₂HPO₄ 10 %). Als Oligomere wurden oSMoMA-2, oSMoMA-3,5, oSMoMA-5, oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10 gewählt, um verschiedene MA-Gehalte zu testen. Zur Charakterisierung der Hydrogele wurden die Methoden ausgewählt, die in Tabelle 6 beschrieben worden sind.

Tabelle 7: Zusammensetzung der jeweiligen Hydrogele für den Vergleich von oSMoMA-2, oSMoMA-3,5, oSMoMA-5, oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10.

Eigenschaft	Gelatine	Imagel®	Chitosan
Lösung natürliches Biopolymer	5,4 % in DMEM/H ₂ O	37,5 % in H ₂ O	3,3 % in 0,05 M HCl
Lösung Base	TEOA 6 %/ K ₂ HPO ₄ 10 %	NMPO 1500 mM	β-GP (0,5 %)
Lösung Oligomer	30 % in DMSO	7 % in DMSO	40 % in DMSO:PG (7:3)
Verhältnis	11:6:1 Gel.:Base: Oligomer	1:1 Premix:Oligomer	10:1 Chitosan: Oligomer

4.4.1 Gelierungskinetik

Bei der Quervernetzungsreaktion bzw. der Gelierungskinetik wurde der Speichermodul (G') zum Bestimmen der Festigkeit verwendet. Dabei wurden sich über 1000 Sekunden die Gelierungskinetiken der natürlichen Biopolymere mit den verschiedenen Oligomeren angeschaut. Bei den Gelatine-Hydrogelen konnten alle Oligomere getestet werden, bei den Imager[®]-Hydrogelen waren nur die Oligomere aufwärts von oSMoMA-5 möglich, da es darunter zu keiner Gelierung kam, und bei den Chitosan-Hydrogelen nur die Oligomere abwärts von oSMoMA-5. Ab einem bestimmten Speichermodul (G'), wie es bei oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10 der Fall war, war eine Messung aufgrund der zu hohen Krafteinwirkung auf das Oszillationsrheometer nicht mehr möglich (roter Messbereich).

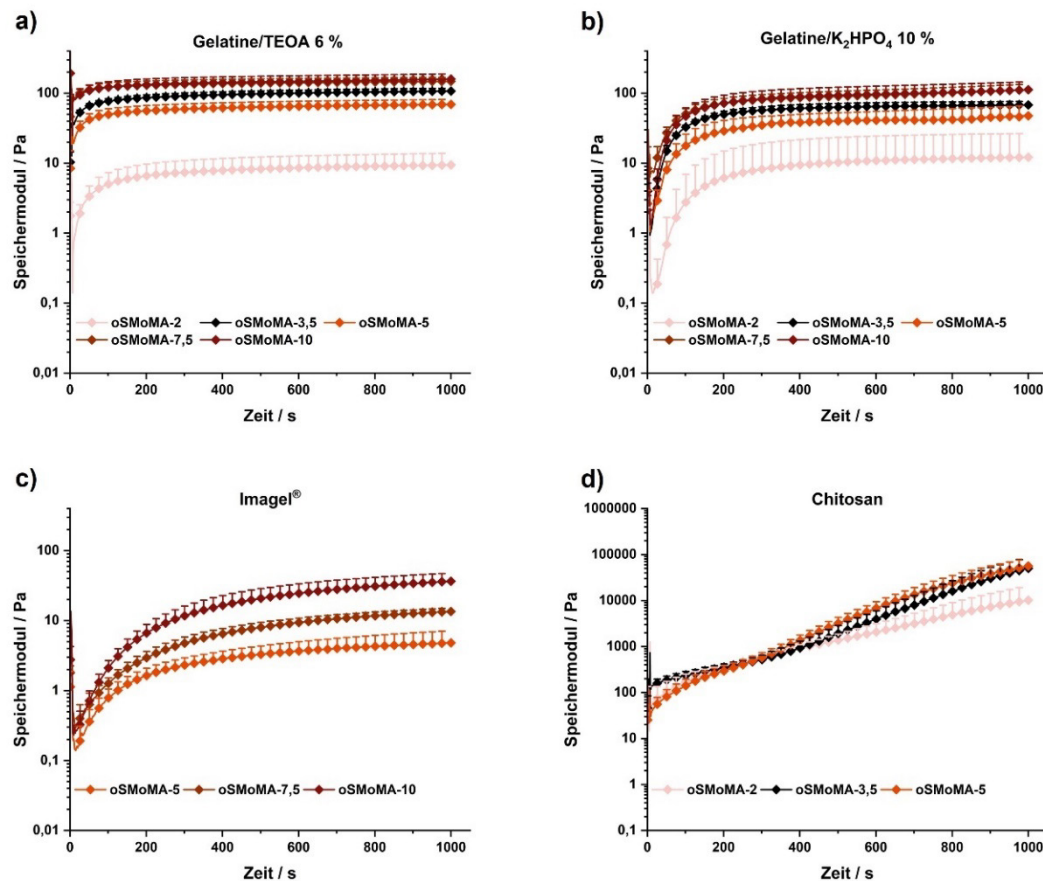


Abbildung 57: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik anhand des Speichermoduls (G') mit a) Gelatine-Hydrogel und TEOA 6 % als Base, b) Gelatine-Hydrogel und K_2HPO_4 10 % als Base, c) Imager[®]-Hydrogel und d) Chitosan-Hydrogel. Verglichen wurden Oligomere mit verschiedenen MA-Gehalten ($n=3$, $MW \pm SD$).

Wie in Kapitel 4.4 wird in Abbildung 57 ersichtlich, dass das Chitosan-Hydrogel deutlich höhere Werte für den Speichermodul (G') erreicht als die zwei anderen Hydrogel-Varianten. Zudem fällt bei allen drei Hydrogelen mit verschiedenen natürlichen Biopolymeren auf, dass der Speichermodul (G') mit höherem MA-Gehalt des Oligomers steigt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch den höheren MA-Gehalt des Oligomers mehr Anhydrid-Gruppen für die Amin-Anhydrid-Konjugation zur Verfügung stehen. Dennoch kann es ab einem bestimmten MA-Gehalt zur Sättigung der freien Amin-Gruppen der natürlichen Biopolymere kommen, sodass eine weitere Erhöhung des MA-Gehaltes nicht zur weiteren Erhöhung des Speichermoduls (G') führt. Dies passiert nach dem der Gelpunkt erreicht worden ist. Dieser beschreibt den Punkt, an dem der Übergang von dem flüssigen in den festen gelartigen Zustand aufgrund der Netzwerkbildung stattfindet. Rheologisch beschreibt er den Übergangspunkt, an dem der Speichermodul (G') den Verlustmodul (G'') übersteigt [73]. Das Erreichen des Plateaus vom Speichermodul (G') nach dem Gelpunkt zeigt dabei das Ende der Quervernetzungsreaktion, in diesem Fall das Ende der Reaktion der Amine mit Anhydriden durch mangelnde Reaktionsdistanz, an [74]. Ein Beispiel ist das Oligomer oSMoMA-3,5 bei den Gelatine-Hydrogelen mit beiden Basen (TEOA 6 % und K_2HPO_4 10 %). Das Oligomer zeigt im Vergleich zu oSMoMA-5 eine deutlich bessere Gelierung, obwohl oSMoMA-5 mehr Anhydrid-Gruppen enthält. Aus diesem Grund gibt es bei den Gelatine-Hydrogelen ein Optimum der Gelierung mit dem Oligomer oSMoMA-3,5. Die weitere Erhöhung des Speichermoduls (G') bei oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10 kann auf gemessene Feststoffbestandteile zurückzuführen sein, da es ab dem Oligomer oSMoMA-7,5 zu Präzipitaten bei der Herstellung der Gelatine-Hydrogele gekommen ist. Wie Abbildung 58 zeigt, sind die Feststoffpartikel an der Trübung des Hydrogels erkennbar. Die Hydrogele mit MA-Gehalten unter 5, zeigten keine Trübung nach der Herstellung. Auch Kohn *et al.* zeigten schon bei einer anderen Art von Oligomer (oPNMA), dass es bei der Quervernetzung mit Gelatine ab einem höheren MA-Gehalt zu einer zu schnellen Gelierung kommen kann, die anschließend zu einer inhomogenen Gelierung führt [48].

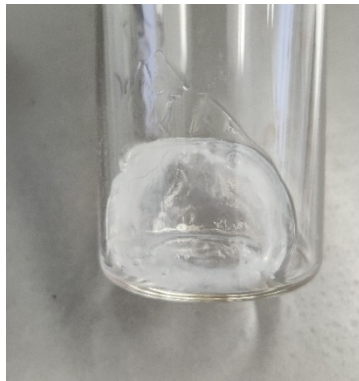


Abbildung 58: Vorfabrizierte Gelatine-Hydrogel im Schnappdeckelglas mit oSMoMA-7,5. Eine Trübung bzw. Präzipitation ist zu erkennen.

Die Gelatine-Hydrogele mit K_2HPO_4 10 % als Base zeigen verglichen zu den Gelatine-Hydrogele mit TEOA 6 % etwas niedrigere Speichermodule (G') und eine langsamere Gelierung. Die rheologischen Eigenschaften der Hydrogele spielen bei der Beurteilung einer Biotinte eine entscheidende Rolle. Ein schneller Gelierungsprozess kann erforderlich sein, um die gewünschte Stabilität der gedruckten Hydrogel-Konstrukte zu erreichen, ein zu schneller Prozess kann wiederum den 3D-Druck-Prozess erschweren [66]. Schaut man sich das Balkendiagramm mit den Werten der Speichermodule (G') bei 1000 Sekunden an (Abbildung 59), werden die steigenden Speichermodule (G') mit steigendem MA-Gehalt nochmal deutlicher sichtbar. Im Vergleich zu den Gelatine- und Imagel®-Hydrogelen zeigen die Chitosan-Hydrogele relativ hohe Standardabweichungen, was für eine inhomogenere Vermischung der Komponenten im Vergleich zu den anderen Hydrogelen spricht. Dieser Aspekt passt zu den Aufnahmen aus Abbildung 55 und kann auf die Herstellungsmethode der Chitosan-Lösung in 0,05 M HCl zurückzuführen sein. Das Chitosan zeigt lediglich im sauren pH-Bereich (unter pH 6,0) eine ausreichende Löslichkeit. Durch die primären Aminogruppen, welche bei niedrigem pH-Wert protoniert werden und so die Wasserlöslichkeit erhöhen, kann das Chitosan als starke Base angesehen werden [75]. Für die Anpassung des pH-Wertes des Hydrogels aufgrund der gewünschten Einbettung von Zellen in den neutralen pH-Bereich, musste die HCl von 0,1 M auf 0,05 M angepasst werden (Abbildung 92). Diese Anpassung kann zu einer erniedrigten Löslichkeit des Chitosans und damit der Gefahr von Präzipitation des Chitosans in der 0,05 M HCl führen.

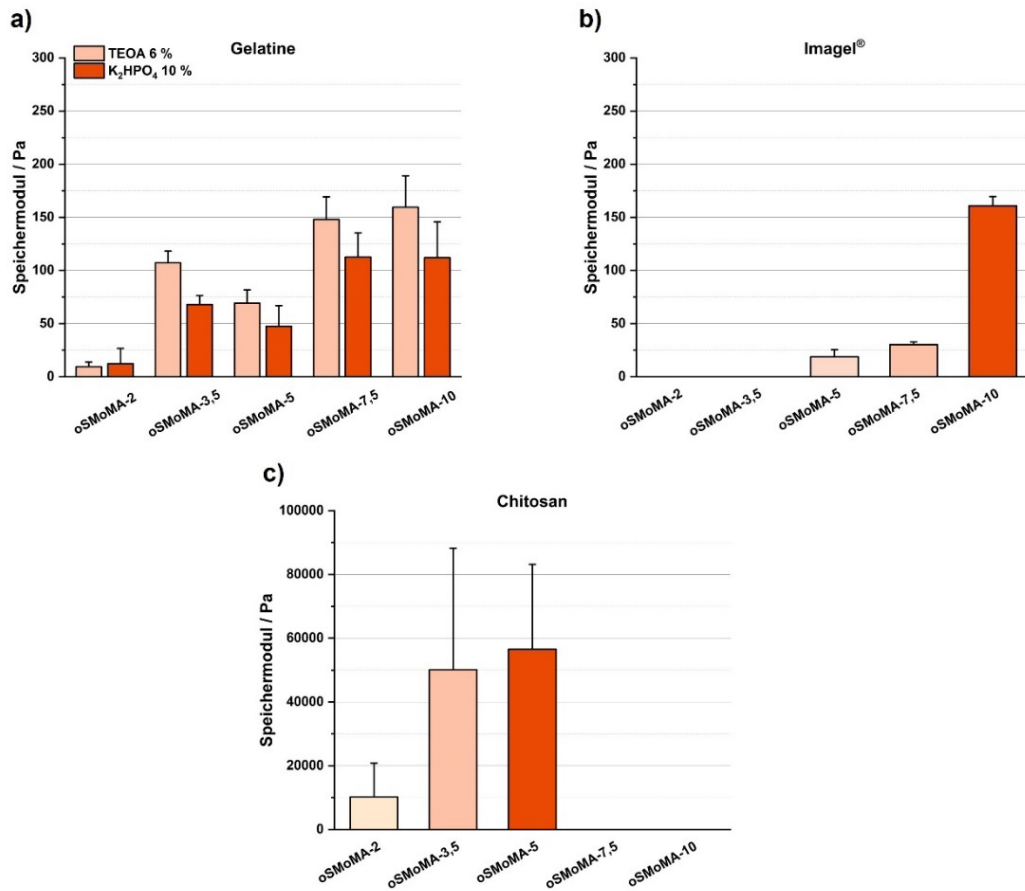


Abbildung 59: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) des Speichermoduls bei 1000 Sekunden (G') mit a) Gelatine-Hydrogel und beiden Basen (TEOA 6 % und K₂HPO₄ 10 %), b) Imager®-Hydrogel und c) Chitosan-Hydrogel. Verglichen wurden Oligomere mit verschiedenen MA-Gehalten ($n=3$, MW $\pm$ SD).

4.4.2 Frequenztest der Hydrogel-Platten

Bei dem Frequenztest wurden die vorfabrizierten Hydrogel-Platten nach definierten Wasch- und Trocknungsschritten auf Festigkeit getestet. Die Hydrogel-Platten sieht man im rehydratisierten Zustand und im lyophilisierten Zustand in Abbildung 60 dargestellt.

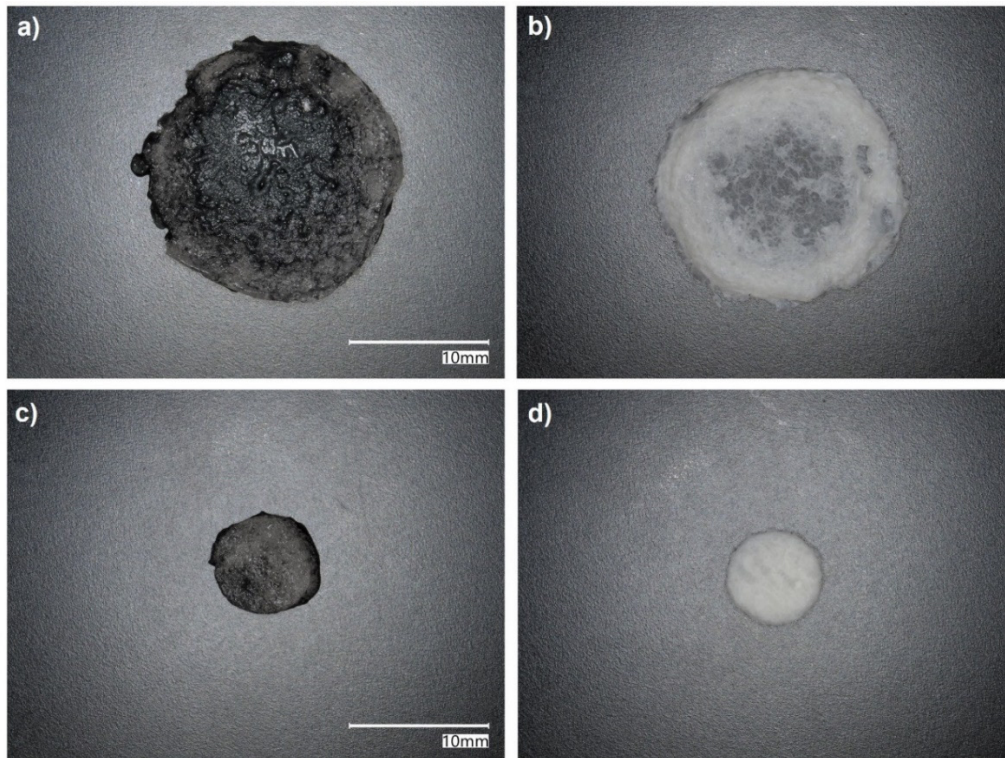


Abbildung 60: Mikroskopische Aufnahmen am Keyence Digitalmikroskop von a) großer hydratisierter Hydrogel-Platte, b) großer lyophilisierter Hydrogel-Platte, c) kleiner gestanzter hydratisierter Hydrogel-Platte und d) kleiner gestanzter lyophilisierter Hydrogel-Platte.

Bei der Messung wurde der Speichermodul (G') bei einer Frequenz von 1 Hz und einer Amplitude von 0,05 % bestimmt. Auch hier zeigt sich bei den Gelatine- und Chitosan-Hydrogelen der Trend, dass die Festigkeit der Hydrogel-Platten mit steigendem MA-Gehalt zunimmt. Dieser Trend war bei Kascholke *et al.* auch schon bei oPDMA als Oligomer kombiniert mit der kurzkettigen Gelatine (COL) sichtbar. Dort sah man auch eine deutliche Erhöhung des Speichermoduls (G') von oPDMA-3,5 zu oPDMA-5,5 [47]. Im Gegensatz zu den Speichermodulen (G') bei den Gelierungskinetiken sind die Werte bei den Oligomeren oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10 hier bei den Hydrogelen mit der Base K_2HPO_4 10 % höher. Aber auch hier können durch die Präzipitationen bei der vorherigen Hydrogel-Herstellung vermehrt Feststoffanteile vorkommen.

Die Ergebnisse (Abbildung 61) verdeutlichen, dass ein Austausch der Base von TEOA 6 % zu K_2HPO_4 10 % problemlos möglich ist. Bei den Imagel[®]-Hydrogelen zeigt sich das Optimum an Festigkeit bei oSMoMA-7,5. Generell sind hier die Werte der Imagel[®]-Hydrogele im Vergleich zu den Gelatine-Hydrogelen deutlich höher als es der Unterschied bei der Gelierungskinetik zeigt. oSMoMA-5 hingegen zeigt bei den Chitosan-Hydrogelen, die bei oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10 sehr hohe Werte zeigen, ein vergleichbarer Speichermodul (G') zu den Hydrogelen von Gelatine und Chitosan. Das verdeutlicht die Variabilität und Einstellungsmöglichkeiten der Hydrogele. Ein Hydrogel mit Chitosan und oSMoMA-5 kann ähnliche Festigkeiten erreichen, wie ein Hydrogel mit beispielsweise Gelatine als natürliches Biopolymer und oSMoMA-7,5 als Oligomer.

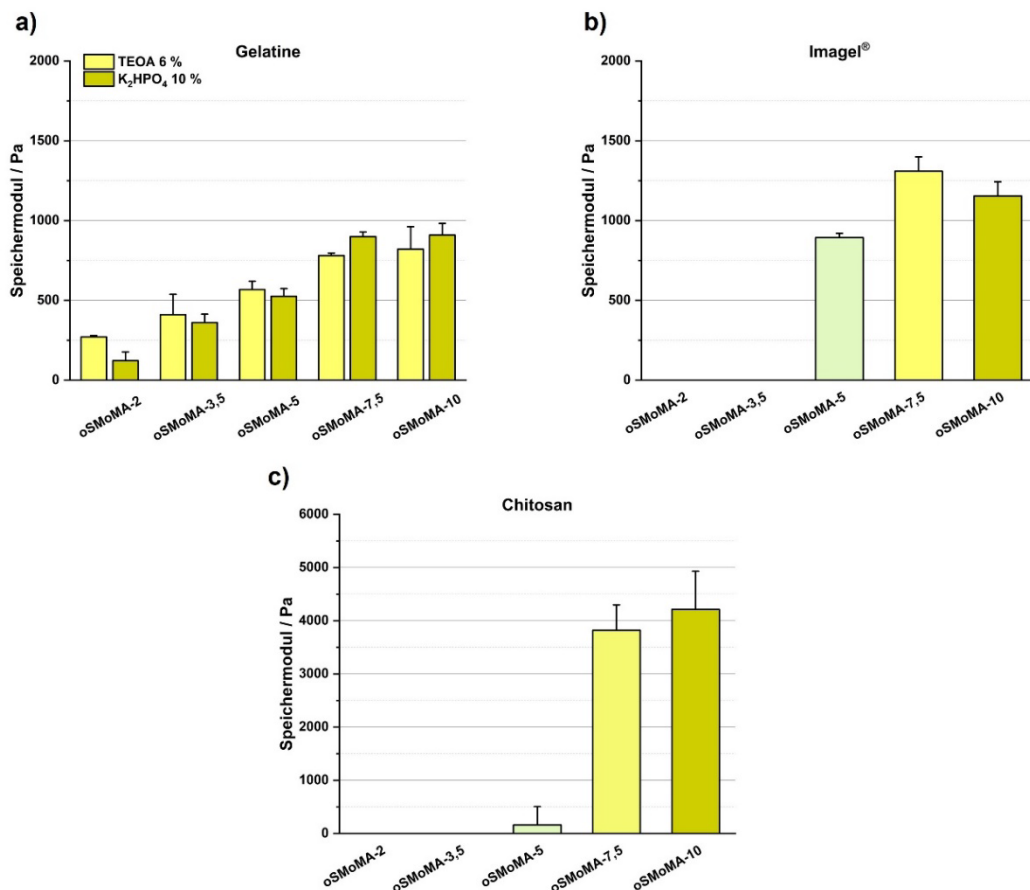


Abbildung 61: Rheologische Charakterisierung (Frequenztest) der kleinen Hydrogel-Platten anhand des Speichermoduls (G') bei 1 Hz mit a) Gelatine-Hydrogel und beiden Basen (TEOA 6 % und K_2HPO_4 10 %), b) Imagel[®]-Hydrogel und c) Chitosan-Hydrogel. Verglichen wurden Oligomere mit verschiedenen MA-Gehalten ($n=3$, MW $\pm$ SD).

4.4.3 Trockengewicht und herauslösbare Anteile

Das Trockengewicht und die herauslösbaren Anteile wurden ebenfalls bei den Hydrogel-Platten nach einer Reihe von Wasch- und Trocknungsschritten bestimmt (Abbildung 62). Die geringsten Trockengewichte und den höchsten Anteil an herauslösbaren Anteil zeigen die Hydrogele, die mit Chitosan hergestellt worden sind. Nahezu 50 % der Feststoffanteile werden durch die Wasch- und Trocknungsschritte aus dem Hydrogel entfernt. Die Hydrogele mit dem höchsten Trockengewicht und herauslösbaren Anteilen von etwa 30 % zeigen die Hydrogele mit Imagel®. Den geringsten Anteil an herauslösbaren Anteilen haben die Gelatine-Hydrogele mit Werten unter 30 %. Ein möglicher Grund für die Unterschiede in den Trockengewichten der einzelnen Biopolymere könnte die unterschiedliche Vernetzungsdichte innerhalb des Hydrogels sein. Jede Biopolymerkette zwischen Chitosan, Gelatine und Gelatinepeptiden (Imagel®) unterscheidet sich in Abstand und Lokalisation der Amine, die für die Vernetzungsreaktion durch Amin-Anhydrid-Konjugation notwendig sind. Aus diesem Grund kann es sein, dass die Abstände oder die Lokalisation der Amine bei einem Biopolymer besser zu den verwendeten Oligomeren passen als bei den anderen Biopolymeren. Eine geringere Vernetzungsdichte, wie zum Beispiel bei Chitosan, würde folglich zu einer höheren Löslichkeit und damit zu einem höheren Verlust an Feststoffanteilen führen. Dabei ist kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Basen und den verschiedenen Oligomeren zu erkennen. Bei den Imagel®- und Chitosan-Hydrogelen hingegen erscheint oSMoMA-7,5 bei diesen Eigenschaften die besten Hydrogele zu ergeben. Loth *et al.* charakterisierten zuvor Hydrogele mit einem Wert der herauslösbaren Anteile von unter 40 % als sehr gute stabile Hydrogele. In diese Kategorie würden die Gelatine- und Imagel®-Hydrogele mit allen Oligomeren fallen [49].

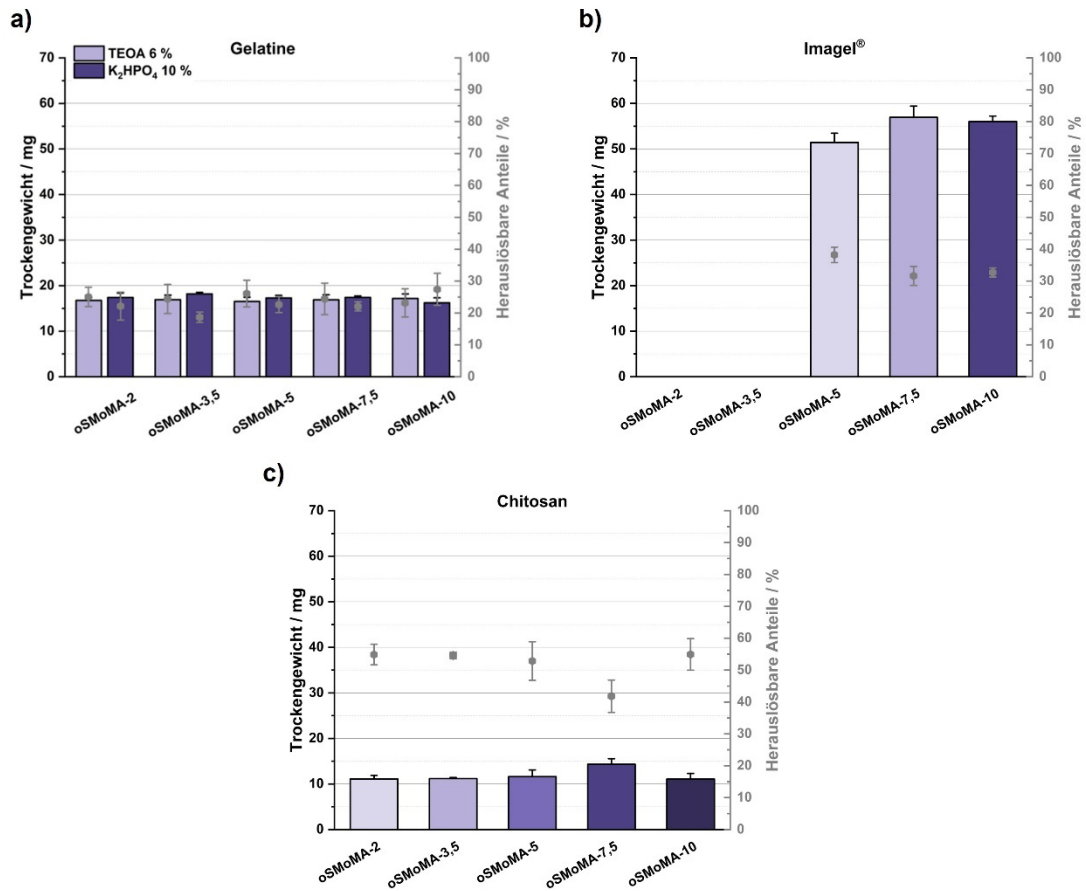


Abbildung 62: Physikochemische Charakterisierung der Hydrogel-Platten über das Trockengewicht (mg) und die herauslösbaren Anteile (%) mit a) Gelatine-Hydrogel und beiden Basen (TEOA 6 % und K₂HPO₄ 10 %), b) Imager®-Hydrogel und c) Chitosan-Hydrogel. Verglichen wurden Oligomere mit verschiedenen MA-Gehalten (n=3, MW ± SD).

4.4.4 Wassergehalt

Bei dem Wassergehalt der Hydrogele ist kein ersichtlicher Trend erkennbar. Dieser liegt für alle Hydrogele unabhängig von Oligomer oder natürlichem Biopolymer zwischen 93 bis 95 % (Abbildung 63). Nach Manish *et al.* stellen 50 % bis 70 % einen niedrigen Wassergehalt und 90 % einen hohen Wassergehalt dar [76]. Tran *et al.* sprechen schon ab 80 % von einem hohen Wassergehalt [77] und für Appel *et al.* handelt es sich bei um die 99 % um einen extrem hohen Wassergehalt [78]. Alle hier hergestellten Hydrogele, unabhängig von natürlichem Biopolymer und Oligomer, zeigen demnach eine Einordnung in den hohen Wassergehalt-Bereich.

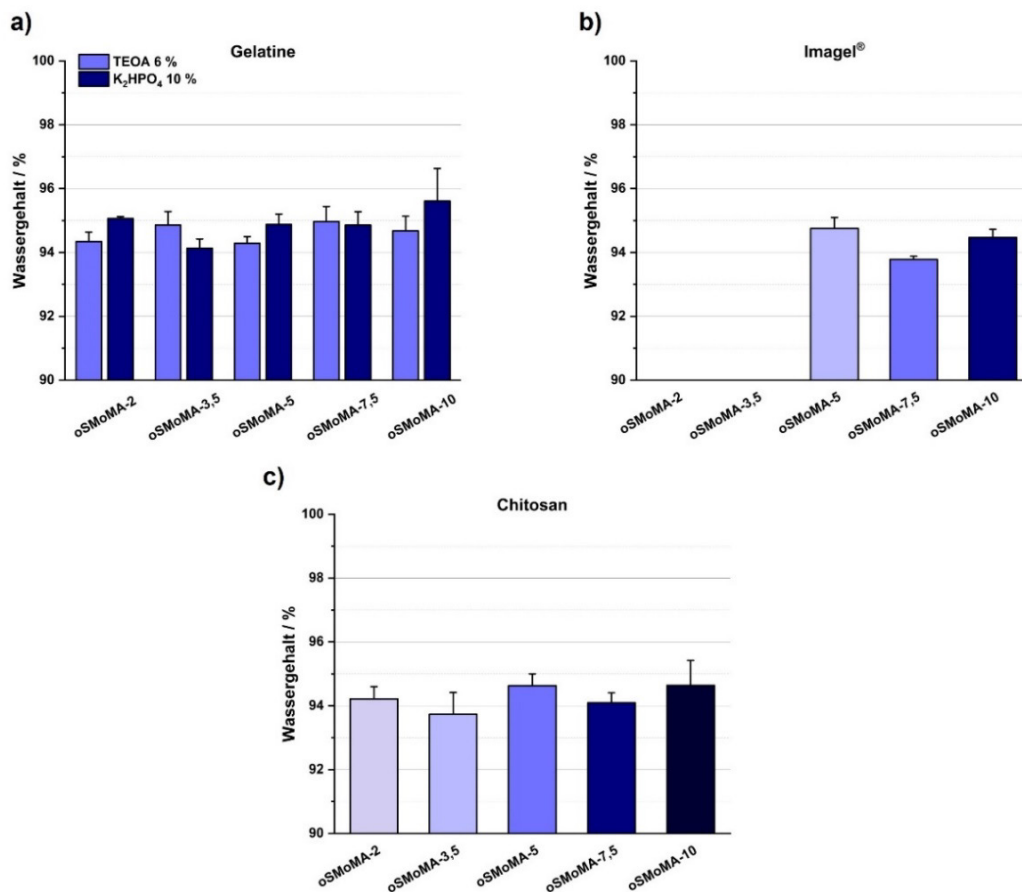


Abbildung 63: Physikochemische Charakterisierung der Hydrogel-Platten über den Wassergehalt (%) mit a) Gelatine-Hydrogel und beiden Basen (TEOA 6 % und K₂HPO₄ 10 %), b) ImageI[®]-Hydrogel und c) Chitosan-Hydrogel. Verglichen wurden Oligomere mit verschiedenen MA-Gehalten (n=3, MW ± SD).

4.4.5 Zusammenfassung

Durch die Wahl des bioabbaubaren Hydrogels und den zugehörigen Komponenten und der Wahl der Art des Oligomers lassen sich Hydrogele mit unterschiedlichen Eigenschaften herstellen. Die Chitosan-Hydrogele zeigten festere Hydrogele mit einer langsameren Gelierung und mit den Imagel®- und Gelatine-Hydrogelen gibt es Hydrogele mit einer geringeren Festigkeit, die sich beispielsweise besser für den 3D-Druckprozess eignen. Die Festigkeit der Hydrogele hat bei der Herstellung von künstlichen Geweben mit biologischen Funktionen für das Bioprinting eine große Bedeutung, da die Morphologie, Adhäsion, Proliferation und Differenzierung der Zellen von dieser abhängt. Für jede Art von Zellen muss eine passende Festigkeit des Hydrogels gefunden werden. Eine zu geringe Festigkeit kann durch das Diffusionsverhalten der Hydrogele nicht für den 3D-Druck geeignet sein, während sich eine zu hohe Festigkeit negativ auf die Lebensfähigkeit der eingebetteten Zellen auswirken kann [79]. Mit dem MA-Gehalt der verschiedenen Oligomere kann eine Feinabstimmung der Eigenschaften vorgenommen werden, wobei nicht jedes natürliche Biopolymer mit jeder Art an Oligomer kompatibel ist. Schon Loth *et al.* zeigten bei der Verwendung von einer anderen Art an Oligomer (oPNMA), dass es ein Optimum an MA-Gehalt für ein bestimmtes Hydrogel geben kann. Das Optimum zeigte sich dort für die Hydrogele, die mit partiell hydrolysiertem Kollagen-Proteinen (COL) oder Gelatine mit einem Bloom-Wert von 50 (Typ B) hergestellt worden sind, bei oPNMA-7,5 [49]. Daher gibt es auch für oSMoMA-x mit jedem natürlichen Biopolymer eine optimale Gelzusammensetzung, wie sie in Tabelle 5 gezeigt ist.

4.5 Eigenschaften und Variationen der Hydrogele

4.5.1 Gelatine-Hydrogele

Bei der Herstellung der Gelatine-Hydrogele wurden viele verschiedene Variationen getestet. Festgelegt worden ist sich bei diesen Versuchen auf eine Konzentration der Basen von TEOA mit 6 % und K_2HPO_4 mit 10 % (siehe Kapitel 4.6, Entwicklung der Biotinten). Es wurden verschiedene Oligomere, verschiedene Verhältnisse, verschiedene Konzentrationen an Oligomer und demineralisiertem Wasser als Lösungsmittel für die Gelatine bzw. DMF als Lösungsmittel für das Oligomer verglichen. Der Fokus lag dabei auf der Charakterisierung der Hydrogele der neuen Generation mit denen, die bereits zuvor in der Literatur für eine andere Art an Oligomeren beschrieben worden sind. Als Charakterisierungsmethoden dienen die Gelierungskinetik, der Frequenztest für die vorgefertigten Hydrogel-Platten, das Trockengewicht, die herauslösbaren Anteile, der Wassergehalt, bei manchen Versuchen auch der Quervernetzungsgrad über das TNBS-Assay und Versuche zur Zellviabilität. Für das TNBS-Assay wurde zuvor eine Kalibriergerade erstellt, um den genauen Grad an Quervernetzung zu bestimmen. Diese ist in Abbildung 64 dargestellt und zeigt ein Bestimmtheitsmaß von 0,9967.

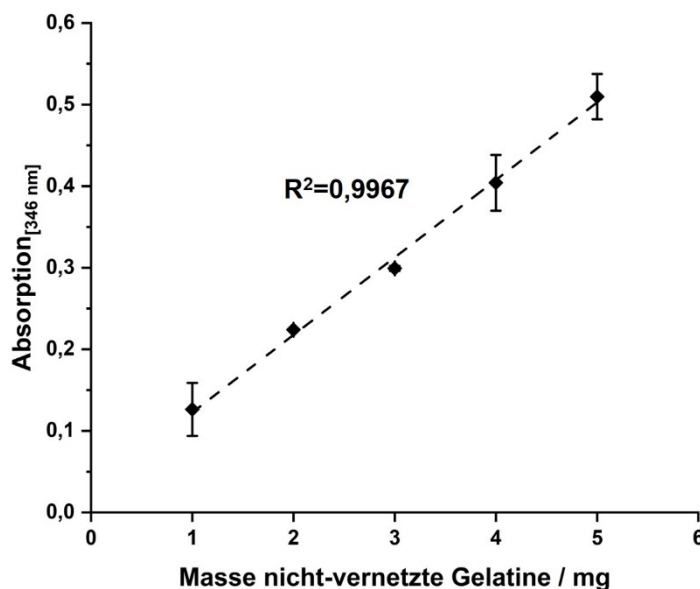


Abbildung 64: Kalibriergerade für die Bestimmung des Quervernetzungsgrades (TNBS-Assay) der Hydrogele über die Masse an nicht-vernetzter Gelatine. Eine höhere Absorption spricht für einen höheren Anteil an nicht-vernetzter Gelatine ($n=3$, $MW \pm SD$).

4.5.1.1 Variation in der Art des Oligomers

Bei diesem Versuch wurden verschiedene Oligomere von oSMoMA-2 bis oSMoMA-10 mit TEOA 6 % und K_2HPO_4 10 % als Basen verglichen. Als Verhältnis der Komponenten zueinander wurde 55:30:5 gewählt. Das Oligomer wurde mit einer Konzentration von 30 % in DMSO gelöst.

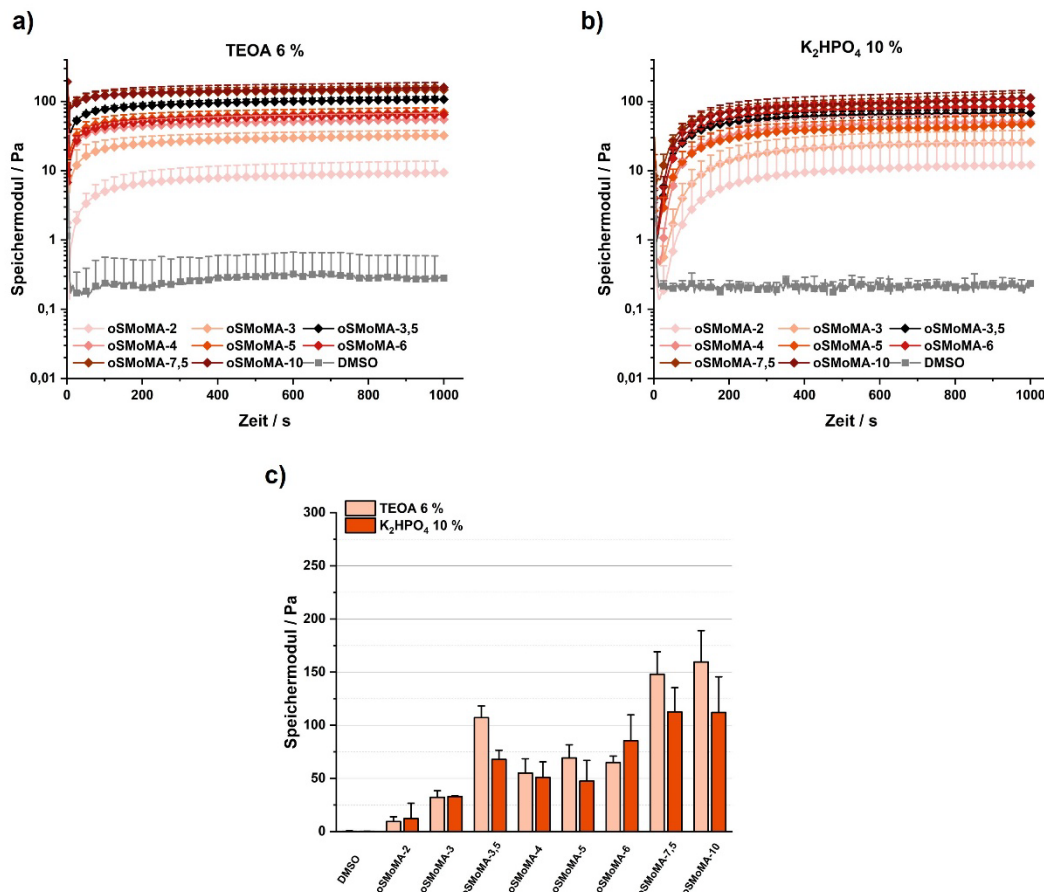


Abbildung 65: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik der Gelatine-Hydrogele anhand des Speichermoduls (G') mit a) TEOA 6 % als Base, b) K_2HPO_4 10 % als Base und c) des Speichermoduls bei 1000 Sekunden (G'). Verglichen wurden Oligomere mit verschiedenen MA-Gehalten und eine Blindprobe mit reinem DMSO ($n=3$, $MW \pm SD$).

Betrachtet man die Gelierungskinetik in Abbildung 65, wird deutlich, dass der Speichermodul (G') und somit die Festigkeit des Hydrogels mit steigendem MA-Gehalt steigt. Dies ist bei beiden Basen der Fall, wobei die Hydrogele mit TEOA 6 % höhere Werte für die Festigkeit (G') und eine schnellere Gelierung zeigen als die Hydrogele mit K_2HPO_4 10 %. Dies konnten auch schon Krieghoff *et al.* zeigen. Sie verglichen die Basen K_2HPO_4 und NMPO bei der Hydrogel-Bildung mit Imagel®. Dort zeigten auch die Hydrogele, die mit K_2HPO_4 hergestellt worden sind, eine langsamere Gelierung und bei der Direktvermischung niedrigere Werte

im Speichermodul (G') als die Hydrogele mit NMPO. Bei TEOA und NMPO handelt es sich um organische Basen und bei K_2HPO_4 um eine anorganische Base. Es wird vermutet, dass die Umsetzung mit der anorganischen Base im Vergleich zur organischen Base eine längere Zeit für die Reaktion braucht. Dennoch stellt der Austausch der Base eine gute Alternative zur organischen Base dar [20]. Im Vergleich zu der Blindprobe mit reinem DMSO und ohne Oligomer-Zusatz zeigen dennoch alle Oligomere einen positiven Effekt auf die Quervernetzung. Auffällig ist zudem, dass bei beiden Basen die Hydrogele mit oSMoMA-3,5 aus der Reihe fallen und höhere Speichermodule (G') zeigen als die Reihenfolge des MA-Gehaltes es bestimmt hätte. Aus diesem Grund scheint es bei oSMoMA-3,5 für diese Zusammensetzung und dieses natürliche Biopolymer ein Optimum mit diesem MA-Gehalt zu geben. Die Gründe dafür könnten eine optimale Polarität des Oligomers bzw. optimale Abstände der MA-Einheiten zueinander sein. Die Werte von oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10 müssen, wie oben schon erwähnt wurde, kritisch betrachtet werden, da es teilweise zu Präzipitation bei der Herstellung kam (Abbildung 58). Bei der Betrachtung der Gelierungskinetik in den ersten 250 Sekunden der Messung wird auch hier deutlich, dass K_2HPO_4 10 % als Base zu einer langsameren Gelierung beiträgt (Abbildung 66). Dies kann für den 3D-Druck von großer Bedeutung sein, wie auch Krieghoff *et al.* schon zeigten [20]. Die Hydrogele mit TEOA 6 % erreichen mit allen Oligomeren ihre Plateau-Werte schnell, während die Werte mit K_2HPO_4 10 % deutlich niedriger beginnen und ihr Plateau erst nach einer gewissen Zeit erreichen.

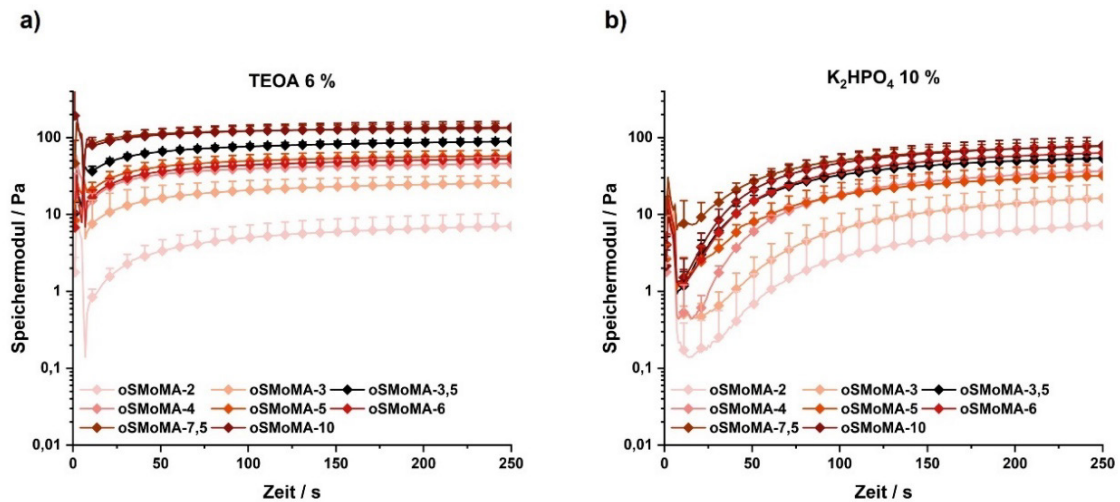


Abbildung 66: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik der Gelatine-Hydrogele anhand des Speichermoduls (G') bis zur 250. Sekunde zur näheren Betrachtung mit a) TEOA 6 % als Base und b) K_2HPO_4 10 % als Base. Verglichen wurden Oligomere mit verschiedenen MA-Gehalten ($n=3$, $MW \pm SD$).

Die Ergebnisse des Frequenzentests der vorfabrizierten Hydrogel-Platten (Abbildung 67) nach bestimmen Wasch- und Trocknungsschritten zeigen den gleichen Trend, der bei der Gelierungskinetik zu erkennen war.

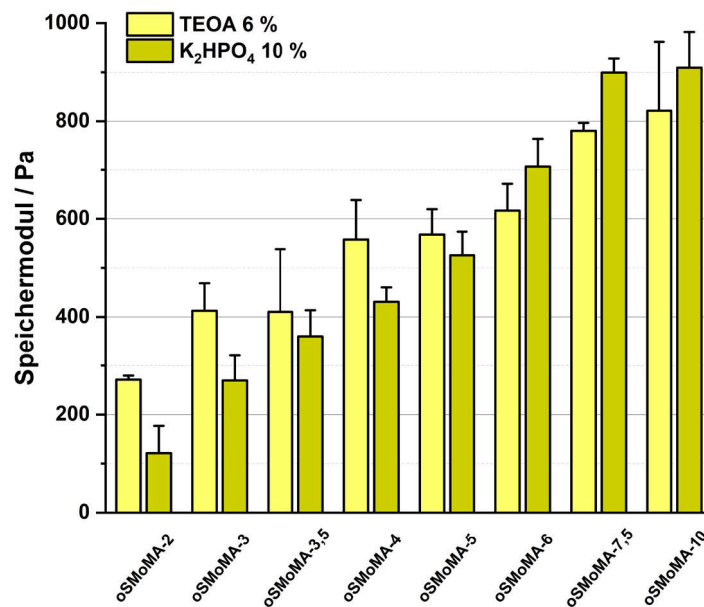


Abbildung 67: Rheologische Charakterisierung (Frequenzentest) der kleinen Hydrogel-Platten der Gelatine-Hydrogele anhand des Speichermoduls (G') bei 1 Hz mit beiden Basen (TEOA 6 % und K_2HPO_4 10 %). Verglichen wurden Oligomere mit verschiedenen MA-Gehalten ($n=3$, $MW \pm SD$).

Mit steigendem MA-Gehalt, steigt auch der Speichermodul (G') und damit die Festigkeit des Hydrogels bei der vorfabrizierten Hydrogel-Platte. Anders als bei der Gelierungskinetik, gibt es hier kein Optimum beim MA-Gehalt von 3,5. Der Vergleich der beiden Methoden miteinander zeigt, dass die Versuche für die Gelierungskinetik die Festigkeit der Hydrogele direkt nach der Herstellung bzw. maximal 15 Minuten nach der Messung verdeutlichen, während der Frequenztest der vorfabrizierten Hydrogel-Platten die Festigkeit nach mehreren Tagen und Wasch- und Trocknungsschritten bestimmt. Aus diesem Grund kann man die beiden Festigkeiten schwer miteinander vergleichen. Es kann vorkommen, dass ein Hydrogel, wie es bei der Gelatine mit oSMoMA-3,5 der Fall ist, direkt nach der Herstellung ein Optimum in der Festigkeit zeigt, aber nach mehreren Tagen nicht mehr mit erhöhter Festigkeit, im Vergleich zu den anderen Oligomeren, auffällt. Bei der Betrachtung der Trockengewichte, der herauslösbaren Anteile und des Wassergehaltes (Abbildung 68) lassen sich keine großen Unterschiede bzw. Auffälligkeiten feststellen. Alle Hydrogele zeigen Ergebnisse mit herauslösbaren Anteilen von unter 40 % [49], die für eine gute Stabilität der Hydrogel-Platten sprechen.

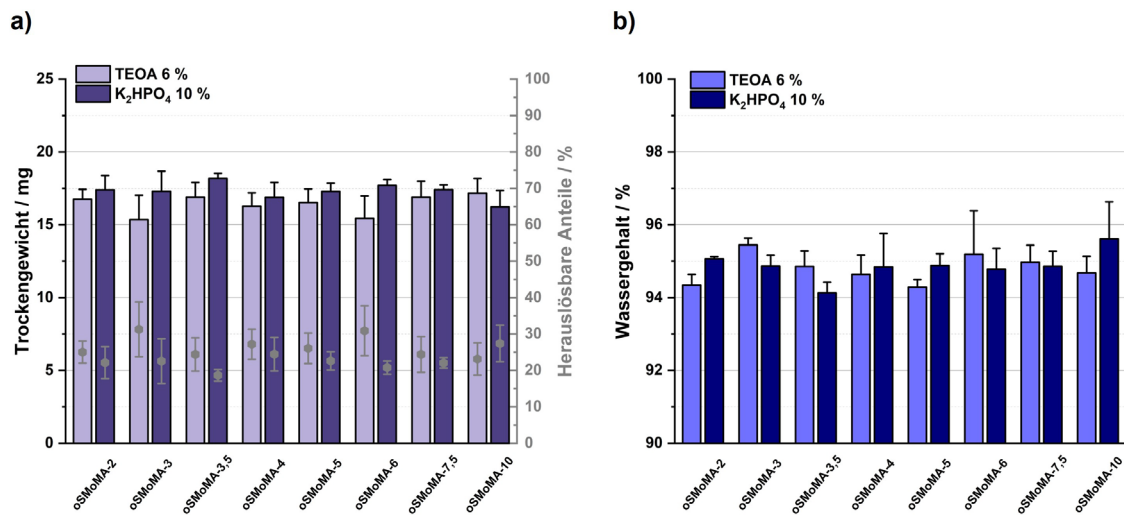


Abbildung 68: Physikochemische Charakterisierung der Hydrogel-Platten der Gelatine-Hydrogele über a) das Trockengewicht (mg) und die herauslösbaren Anteile (%) und b) den Wassergehalt (%) mit jeweils beiden Basen (TEOA 6 % und K₂HPO₄ 10 %). Verglichen wurden Oligomere mit verschiedenen MA-Gehalten ($n=3$, MW $\pm$ SD).

Das TNBS-Assay dient zur Beurteilung des Quervernetzungsgrades des vorfabrizierten Hydrogels und gibt Auskunft darüber, wie viele Amin-Gruppen der Gelatine tatsächlich eine Quervernetzung mit den Anhydriden der Oligomere eingegangen sind. In Abbildung 69 wird ersichtlich, dass alle Quervernetzungsgrade mit 30-40 % sehr nah beieinander liegen. Verglichen zu den bisher veröffentlichten Werten für oPNMA mit COL (50-80 %), oPNMA mit Gelatine Typ B und einem Bloom-Wert von 50 (30-75 %) [49] und oPDMA mit COL (40-65 %) [47] liegen die Gelatine-Hydrogele mit oSMoMA unter den Quervernetzungsgraden der bisherigen Hydrogele. Ein direkter Vergleich der Hydrogele ist jedoch nicht möglich, da für die Herstellung der Hydrogele unter anderem unterschiedliche Oligomere, unterschiedliche natürliche Biopolymere und unterschiedliche Lösungsmittel für das Oligomer verwendet wurden. Bei oPNMA und oPDMA handelt es sich um Oligomere, die im Vergleich zu oSMoMA PEDAS als lipophilen Baustein eingebaut haben [47, 49]. Im Gegensatz zu Stearylacrylat (SA) aus oSMoMA, das nur einarmig ist, handelt es sich bei PEDAS um ein zweiarmiges Polymer. Diese zweiarmige Struktur könnte zu einer höheren Quervernetzungsdichte mit dem natürlichen Biopolymer und damit zu einem höheren Quervernetzungsgrad führen. Eine andere Begründung könnte zudem in dem verwendeten Lösungsmittel für das Oligomer liegen. Im Gegensatz zu den Gelatine-Hydrogelen dieser Arbeit wurde bei den zuvor hergestellten Hydrogelen DMF als Lösungsmittel verwendet. Da sich DMSO und DMF in ihrer Polarität geringfügig unterscheiden [80] kann es zu einer unterschiedlichen lösungsmittelbedingten Faltung der Polymere bzw. zu einer unterschiedlichen Polarisierung der für die Vernetzung notwendigen Anhydride und Amine kommen, was ebenfalls einen Einfluss auf die Reaktionseffektivität und damit auf den Quervernetzungsgrad haben kann. Das Oligomer oSMoMA-3,5 zeigt auch hier bei beiden Basen neben oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10 die vielversprechendsten Ergebnisse. Ein hoher Quervernetzungsgrad kann für eine erhöhte Stabilität des Hydrogels sprechen, da an vielen Stellen eine Amin-Anhydrid-Konjugation stattfinden kann, die in diesem Fall für die Quervernetzung notwendig ist. Trotzdem können auch wenige Quervernetzungspunkte zu einem stabilen Hydrogel-Netzwerk führen, sodass die Hydrogele mit oSMoMA nicht unbedingt schlechter sein müssen.

Manche Oligomere erreichen einen höheren Quervernetzungsgrad mit TEOA 6 % und manche mit K_2HPO_4 10 %, sodass sich aus diesen Ergebnissen nicht schlussfolgern lässt, welche Base besser geeignet wäre.

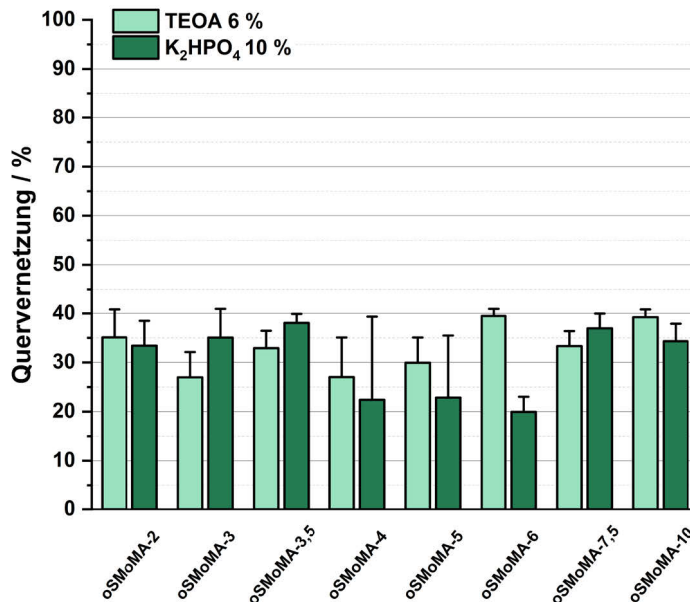


Abbildung 69: Charakterisierung der Hydrogel-Platten der Gelatine-Hydrogele in Bezug auf den Quervernetzungsgrad der Gelatine (TNBS-Assay) mit beiden Basen (TEOA 6 % und K_2HPO_4 10 %). Verglichen wurden Oligomere mit verschiedenen MA-Gehalten ($n=3$, $MW \pm SD$).

Als letztes Experiment in dieser Versuchsreihe wurden alle Gelatine-Hydrogele mit verschiedenen Oligomeren und beiden Basen auf Zellkompatibilität untersucht. Dafür wurden wie oben beschrieben die murinen embryonalen 3T3-Fibroblasten genutzt und mit dem WST-8-Zellviabilitätsreagenz die Zellviabilität über 7 Tage beurteilt. Dafür wurden, wie in den Methoden beschrieben worden ist, die Zellen direkt in das Hydrogel eingebettet. Um das Hydrogel mit den Zellen in Verbindung bringen zu können, muss zwischen verschiedenen Methoden unterschieden werden. Dabei gibt es die Möglichkeit die Zellen direkt in das Hydrogel einzubetten, wie es in dieser Arbeit und auch bei Hoang Thi *et al.* der Fall ist [81] oder die Zellen unter dem Hydrogel oder auf das Hydrogel auszusäen. Thonhoff *et al.* nutzten die Methode und säten die Zellen unter dem Hydrogel aus [82], wohingegen in den bisherigen Veröffentlichungen dieser Arbeitsgruppe die Zellen adhärent auf vorgefertigte Hydrogele ausgesät wurden[46, 47].

Mit dem Hinblick auf die Entwicklung einer Biotinte ist die Einbettung der Zellen in das Hydrogel sinnvoller, um das Prinzip auf den späteren Druckprozess zu übertragen. Aus Abbildung 70 wird deutlich, dass es unabhängig von dem Oligomer oder der Base zu einem Anstieg der Zellviabilität bis Tag 7 kommt. Der größte Sprung wird bei allen Hydrogelen zwischen Tag 3 und Tag 7 erreicht, was auf eine erfolgreiche 3D-Zellkultur durch Zellwachstum und Proliferation der eingebetteten Zellen hinweist. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass die Zellen erfolgreich in ein Gerüst oder eine Matrix eingebettet wurden und in der Lage sind, Signale aus allen Richtungen sowohl von dem Gerüst als auch von den umgebenden Zellen zu empfangen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen zuvor in einer Vorläuferlösung für ein Hydrogel - in diesem Fall in der Gelatine-Lösung - suspendiert und anschließend durch die Quervernetzungsreaktion unter Bildung eines Hydrogels in der Matrix eingeschlossen. Nahezu alle gewebebildenden Zellen sind in eine extrazelluläre Matrix (EZM) eingebettet, die den Zellen biochemische und physikalische Signale vermittelt. Das Hydrogel als Matrix ahmt damit die EZM nach und muss sicherstellen, dass Sauerstoff und Nährstoffe in das Hydrogel diffundieren können und Abfallprodukte der Zellen abtransportiert werden können [83]. Eingebettet in die Matrix binden sich die Zellen zuerst über Adhäsionsmoleküle an diese. Im Fall der Gelatine fördern zum Beispiel spezifische Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenzen (RGD) die Zelladhäsion und damit auch Ausbreitung der Zellen [84, 85]. Bestimmte mechanische Eigenschaften wie Festigkeit und Struktur des Hydrogels bestimmen die anschließende Migration bzw. Verteilung der Zellen in der Matrix, bevor die Zellproliferation beginnt [86]. Idealerweise sollte die Abbaugeschwindigkeit des Hydrogels der Zellproliferation entsprechen, um einen Stabilitätsverlust zu vermeiden [87]. In Abbildung 70 zeigt sich zudem, dass die Zellviabilität ab oSMoMA-4 im Vergleich zu oSMoMA-2, oSMoMA-3 und oSMoMA-3,5 bei beiden Basen deutlich in der Höhe der Absorption abnimmt. Die beste Zellkompatibilität mit höchster Absorption zeigen daher die Oligomere von oSMoMA-2 bis oSMoMA-3,5. Die Tendenz zeigt sich auch schon an Tag 1 unmittelbar nach der Einbettung der Zellen in die Hydrogele. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Hydrogele ab oSMoMA-4 auch in der Qualität abnehmen. Ab oSMoMA-4 verlieren die Hydrogele an Stabilität, sodass eine erfolgreiche Einbettung der gesamten Anzahl an Zellen in das Hydrogel durch

mangelnde Stabilität erschwert sein könnte. Insgesamt ist aber keines der Oligomere als zelltoxisch anzusehen, da es bei allen Oligomeren zu einem Zellwachstum bis Tag 7 kommt.

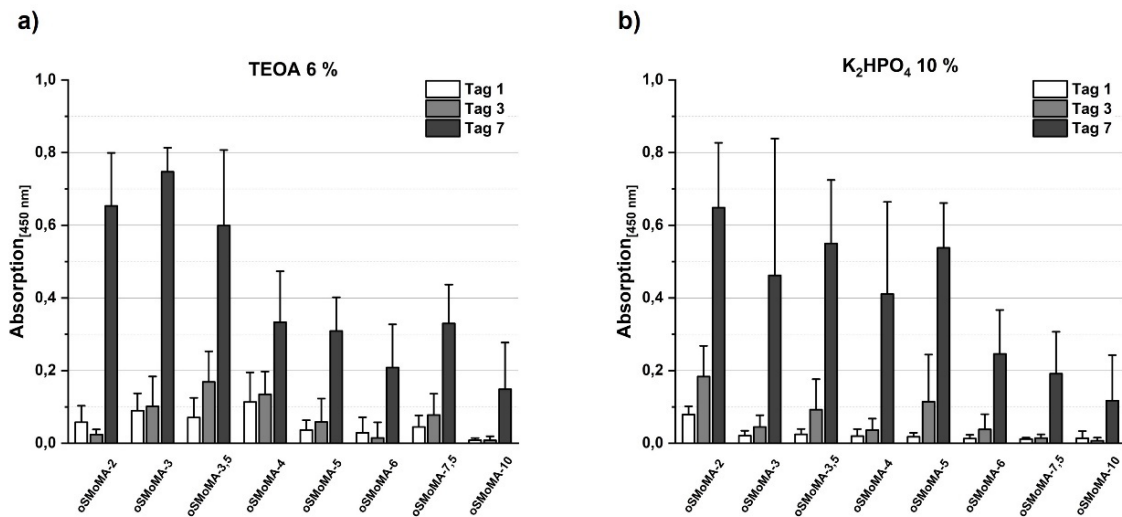


Abbildung 70: Zytokompatibilität der Gelatine-Hydrogele mit den murinen embryonalen 3T3-Fibroblasten und mit a) TEOA 6 % als Base oder b) K₂HPO₄ 10 % als Base über 7 Tage. Verglichen wurden Oligomere mit verschiedenen MA-Gehalten ($n=4$, MW $\pm$ SD).

Auch andere Arbeitsgruppen haben in Ihren Arbeiten bereits ähnliche Experimente durchgeführt. Thonhoff *et al.* haben beispielsweise in Ihren Experimenten mehrere Hydrogele getestet, die besonders für das Tissue Engineering vom empfindlichen Nervensystem geeignet sind. Untersucht wurden Pluronic F127 (PF), ein Blockpolymer aus Propylenoxid und Ethylenoxid, das Matrigel® (MG) und PuraMatrix (PM), ein synthetisches Peptidhydrogel, welches aus ionischen, selbstkomplementären Oligopeptiden besteht. In diesem Fall wurden die humanen neuronalen Stammzellen auf den Boden der Mikrotiterplatte ausgesät und für 5 Tage aktiviert. Anschließend wurden die Zellen 2 Tage mit dem jeweiligen Hydrogel behandelt und ein WST-1 Assay durchgeführt [82]. Beim WST-1-Assays wird ebenfalls ein Formazan-Farbstoff gebildet, der in Zusammenhang mit der Stoffwechselaktivität von Zellen steht [88]. Die Ergebnisse von Thonhoff *et al.* mit humanen neuronalen Stammzellen zeigten, dass bei 450 nm alle Absorptionen im ähnlichen Bereich (Absorption von 0,2 bis 0,7) zu den Hydrogelen aus dieser Arbeit lagen. Manche Hydrogel-Zusammensetzungen zeigten dabei in gewissen Konzentrationen einen positiven und manche einen negativen Effekt auf das Zellwachstum. Auch Hoang Thi *et al.* überprüften in ihrer Arbeit die Zellproliferation

von humanen Hautfibroblasten nach Einbettung in deren Hydrogelen mit dem WST-1 Assay. Dafür nutzen sie ein Hydrogel aus Gelatine-Poly(ethylenglykol)-tyramin (GPT), welches mit Gelatine-Hydroxyphenylpropionsäure (GH) quervernetzt worden ist. Untersucht wurde die Zellproliferation an Tag 10 mit unterschiedlichen prozentualen Zusammensetzungen der beiden Hydrogel-Bestandteile. Hier konnten Hoang Thi *et al.* zeigen, dass sie durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Hydrogele unterschiedliche Daten für die Zellviabilität erreichen konnten. Je höher der Anteil an Gelatine-Hydroxyphenylpropionsäure (GH) war, desto höher war die Extinktion bei 450 nm und damit die Zellviabilität an Tag 10. Die Extinktionen von Hoang Thi *et al.* lagen dabei ebenfalls im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit, erreichten aber auch deutlich höhere Werte mit Absorptionen bis 1,2 [81]. Beachtet werden muss, dass Tag 10 in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht worden ist und Tag 7 hier der späteste betrachtete Zeitpunkt war. Es besteht die Möglichkeit, dass hier an Tag 10 auch höhere Werte erreicht, werden können. Da in dem Fall von Thonhoff *et al.* und Hoang Thi *et al.* aber nur ein einzelner Tag betrachtet worden ist und kein Zeitraum über mehrere Tage, lassen sich schwer exakte Vergleiche zu dem oben genannten Experiment ziehen. Berücksichtigt man alle Charakterisierungsmethoden der Gelatine-Hydrogele aus dieser Arbeit gemeinsam stellt sich heraus, dass oSMoMA-3,5 die vielversprechendsten Ergebnisse für die Verwendung als Biotinte zeigt.

4.5.1.2 Variation in dem Verhältnis der Komponenten zueinander

In diesem Versuchsteil wurden die Ursprungszusammensetzungen des Gelatine-Hydrogels mit der Weiterentwicklung verglichen. Betrachtet wurden die Verhältnisse 50:30:10 (alt) und 55:30:5 (neu) und die Oligomer-Konzentration von 60 % oder 30 %. Für alle Versuche wurde das Oligomer oSMoMA-3,5 verwendet. Als Basen wurde hier TEOA 8 % als ursprüngliche Konzentration und TEOA 6 % als Weiterentwicklung verglichen. Die ursprüngliche Zusammensetzung hatte ein Verhältnis von 50:30:10, eine Basen-Konzentration von etwa 8,3 % und eine Oligomer-Konzentration von 60 % [30]. Zur Vereinfachung wurden hier 8 % als Basen-Konzentration gewählt. Daraufhin wurden Weiterentwicklungen bei dem Verhältnis mit 55:30:5, der Basen-Konzentration von 6 % und der Oligomer-Konzentration von 30 % vorgenommen (siehe Kapitel 4.6). Bei jeder Abbildung ist rechts als kleinere Grafik der Vergleich der Basen-Konzentration von TEOA 8 % und TEOA 6 % mit ursprünglicher Zusammensetzung gezeigt (b). Links sind die verschiedenen Weiterentwicklungen dargestellt (a). Bei Betrachtung der Gelierungskinetik in Abbildung 71 wird deutlich, dass die Erniedrigung der Basen-Konzentration auf TEOA 6 % keinen Einfluss auf die Höhe des Speichermoduls (G') und somit der Festigkeit des Hydrogels zeigt.

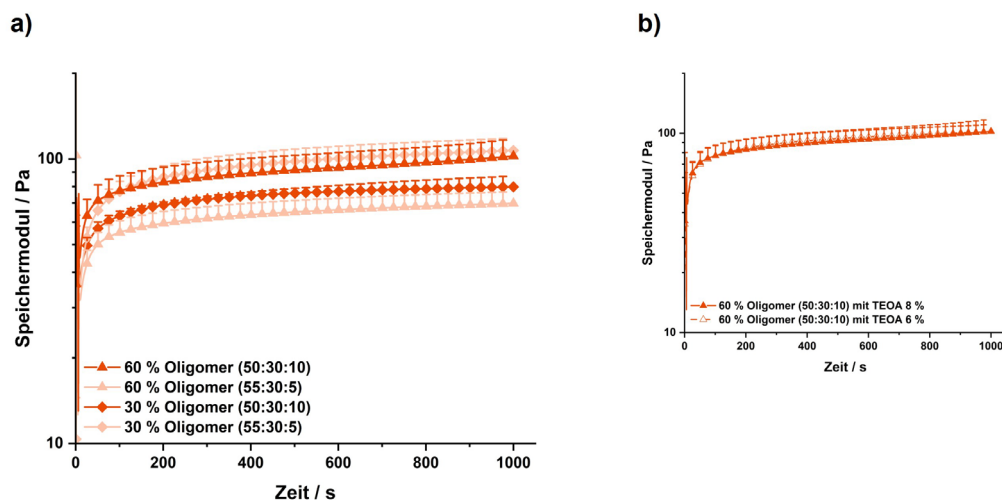


Abbildung 71: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik des Gelatine-Hydrogels, mit TEOA als Base, anhand des Speichermoduls (G') mit a) allen Verhältnissen und Oligomer-Konzentrationen und b) 50:30:10 als Verhältnis mit 60 % Oligomer-Lösung und dem Vergleich zwischen TEOA 8 % und TEOA 6 %. Verglichen wurden verschiedene Zusammensetzungen und Oligomer-Konzentrationen ($n=3$, $MW \pm SD$).

Beide Speichermodule am Ende der Reaktion liegen auf identischer Höhe (Abbildung 72). Bei den anderen Weiterentwicklungen ist deutlich zu erkennen, dass eine erhöhte Oligomer-Konzentration von 60 % nur bei dem Verhältnis 50:30:10 einen Einfluss zeigt, der jedoch auch nicht signifikant ist. Bei dem Verhältnis 55:30:5 reichen 30 % Oligomer im Gegensatz zu 60 % Oligomer für eine signifikant erhöhte Festigkeit aus. Eine weitere Erhöhung der Basen- und Oligomer-Konzentration, ohne Notwendigkeit, könnte die Zytotoxizität der Zusammensetzung erhöhen.

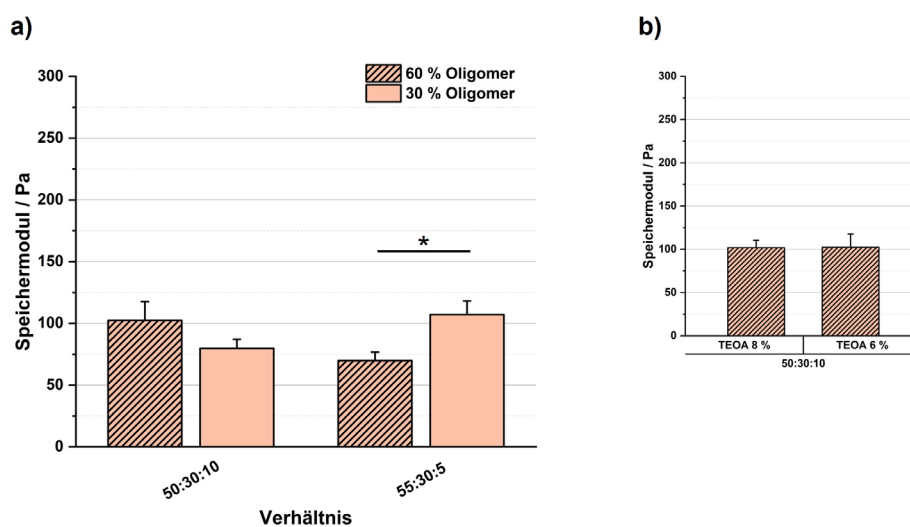


Abbildung 72: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik des Gelatine-Hydrogels, mit TEOA als Base, anhand des Speichermoduls (G') bei 1000 Sekunden mit a) allen Verhältnissen und Oligomer-Konzentrationen und b) 50:30:10 als Verhältnis mit 60 % Oligomer-Lösung und dem Vergleich zwischen TEOA 8 % und TEOA 6 %. Verglichen wurden verschiedene Zusammensetzungen und Oligomer-Konzentrationen ($n=3$, $MW \pm SD$). Die statistische Analyse wurde mit dem Welch-t-Test durchgeführt (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ und * $p < 0,05$).

Die besten Ergebnisse im Hinblick auf die Festigkeit bei der Gelierungskinetik liefern die Ursprungs-Zusammensetzung mit 50:30:10 als Verhältnis und 60 % Oligomer und die neue Zusammensetzung mit 55:30:5 als Verhältnis und 30 % Oligomer. Zwischen diesen beiden Hydrogelen konnte im statistischen Test auch kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Die Ergebnisse des Frequenzentests (Abbildung 73) der vorfabrizierten Hydrogel-Platten zeigen ebenfalls keinen Unterschied zwischen der Basen-Konzentration von TEOA 8 % oder TEOA 6 %. Hier zeigt sich aber für beide Oligomer-Konzentrationen (30 % und 60 %) eine erhöhte Festigkeit bzw. Stabilität bei dem ursprünglichen Verhältnis von 50:30:10. Zwischen den beiden Verhältnissen konnte kein signifikanter positiver Effekt der erhöhten Oligomer-Konzentration von 60 % auf den

Speichermodul (G') bzw. die Festigkeit des Hydrogels gezeigt werden. Das Verhältnis 55:30:5 mit 30 % Oligomer-Konzentration erreicht aber auch hier die identische Höhe des Speichermoduls (G') verglichen mit dem Verhältnis 50:30:10 und 60 % Oligomer-Lösung.

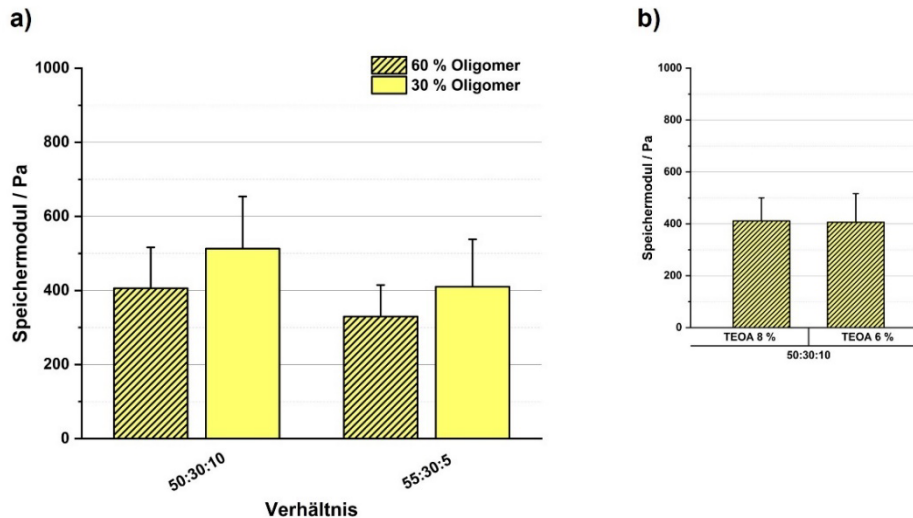


Abbildung 73: Rheologische Charakterisierung (Frequenztest) der kleinen Hydrogel-Platten der Gelatine-Hydrogele, mit TEOA als Base, anhand des Speichermoduls (G') bei 1 Hz mit a) allen Verhältnissen und Oligomer-Konzentrationen und b) 50:30:10 als Verhältnis mit 60 % Oligomer-Lösung und dem Vergleich zwischen TEOA 8 % und TEOA 6 %. Verglichen wurden verschiedene Zusammensetzungen und Oligomer-Konzentrationen ($n=3$, $MW \pm SD$). Die statistische Analyse wurde mit dem Welch-t-Test durchgeführt (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ und * $p < 0,05$).

Beim Trockengewicht und den herauslösbaren Anteilen hingegen zeigt sich, wie Abbildung 74 zeigt, ein signifikanter Vorteil der Oligomer-Konzentration von 30 % gegenüber der von 60 % bei beiden Verhältnissen. Bei der ursprünglichen Zusammensetzung (50:30:10 und 60 % Oligomer) liegt der Anteil der herauslösbaren Anteile sogar bei etwa 70 %, bei der neuesten Zusammensetzung (55:30:5 und 30 % Oligomer) nur bei etwa 25 %. Der hohe Anteil an herauslösbaren Anteilen bei der ursprünglichen Zusammensetzung ist vermutlich auf die nicht-reagierten Oligomere zurückzuführen. Nach der Beurteilung von Loth *et al.* [49] ist das Ergebnis von 25 % herauslösbaren Anteilen ein sehr gutes Ergebnis. Andere Hydrogele, an denen die Zytokompatibilität zur Nutzung als Biomaterial getestet wurde, zeigen mit 55 bis 61 % deutlich höhere Werte für die herauslösbaren Anteile [89].

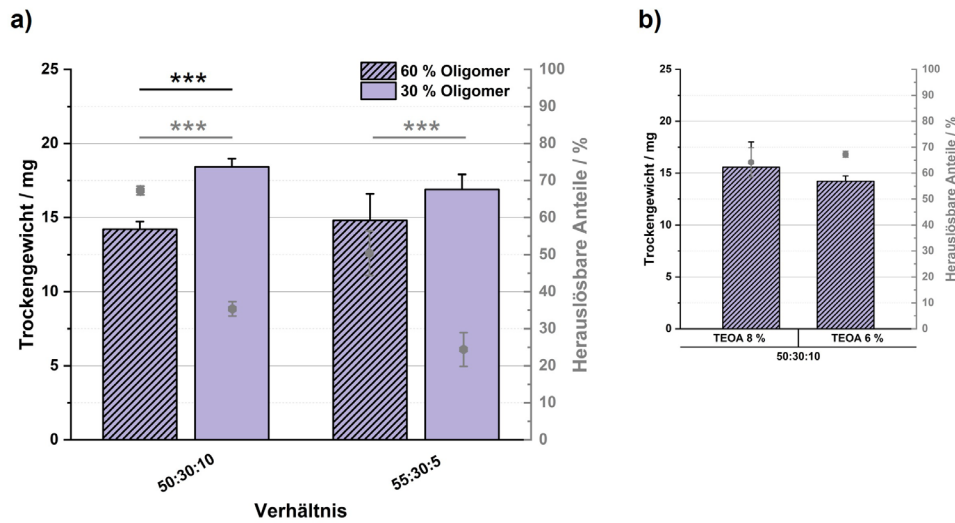


Abbildung 74: Physikochemische Charakterisierung der Hydrogel-Platten der Gelatine-Hydrogele, mit TEOA als Base, über das Trockengewicht (mg) und die herauslösbaren Anteile (%) und mit a) allen Verhältnissen und Oligomer-Konzentrationen und b) 50:30:10 als Verhältnis mit 60 % Oligomer-Lösung und dem Vergleich zwischen TEOA 8 % und TEOA 6 %. Verglichen wurden verschiedene Zusammensetzungen und Oligomer-Konzentrationen ($n=3$, $MW \pm SD$). Die statistische Analyse wurde mit dem Welch-t-Test durchgeführt (** $p < 0,001$, * $p < 0,01$ und * $p < 0,05$).

Werden beide Verhältnisse betrachtet, zeigen die Hydrogele mit 30 % Oligomer deutlich bessere Ergebnisse verglichen zu der 60%igen Oligomer-Lösung. Dies konnte mit dem Welch-t-Test bestätigt werden. Auch hier zeigen beide Basen-Konzentrationen nahezu identische Werte. Der Wassergehalt aller Hydrogele liegt hier mit 94 bis 95 % sehr eng beieinander und signifikante Unterschiede zwischen den Oligomer-Konzentrationen konnten nicht gezeigt werden, wie Abbildung 75 zeigt. Den geringsten Wassergehalt zeigt das Hydrogel mit der ursprünglichen Zusammensetzung und der erhöhten Oligomer-Konzentration (60 %). Weitere Schlüsse können aus dieser Abbildung nicht gezogen werden.

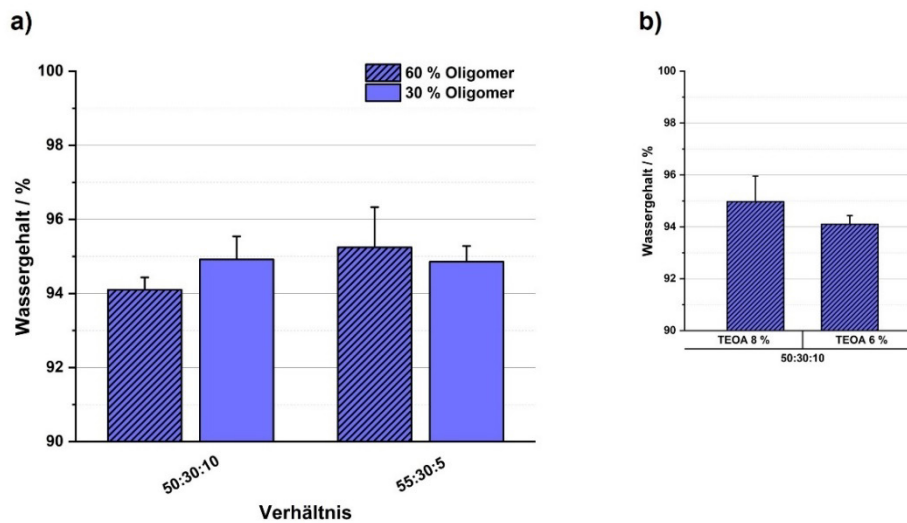


Abbildung 75: Physikochemische Charakterisierung der Hydrogel-Platten der Gelatine-Hydrogele, mit TEOA als Base, über den Wassergehalt (%) und mit a) allen Verhältnissen und Oligomer-Konzentrationen und b) 50:30:10 als Verhältnis mit 60 % Oligomer-Lösung und dem Vergleich zwischen TEOA 8 % und TEOA 6 %. Verglichen wurden verschiedene Zusammensetzungen und Oligomer-Konzentrationen ($n=3$, $MW \pm SD$). Die statistische Analyse wurde mit dem Welch-t-Test durchgeführt (** $p < 0,001$, * $p < 0,01$ und * $p < 0,05$).

Der Quervernetzungsgrad, welcher über das TNBS-Assay bestimmt worden ist, zeigt den größten und einzigen signifikanten Unterschied zwischen der 30%igen Oligomer-Lösung und der 60%igen Oligomer-Lösung bei dem Verhältnis von 55:30:5 (Abbildung 76). Dort liegt das 60%ige Oligomer bei einem Quervernetzungsgrad von etwa 60 %, während alle anderen Hydrogele Werte zwischen 20 bis 40 % aufweisen. Die Basen-Konzentrationen von TEOA 8 % und TEOA 6 % liegen beide bei etwa 40 % Quervernetzungsgrad, wobei das TEOA 8 % leicht über dem Hydrogel mit TEOA 6 % liegt. Bei einer höheren Konzentration an TEOA kommt es zu einem höheren pH-Wert, der zu einer verbesserten Nukleophilie und damit Reaktivität der Amine führt. Die Ergebnisse des TNBS-Assays sprechen dafür, dass die Teile, die bei einer Oligomer-Konzentration von 60 % tatsächlich quervernetzt sind, einen höheren Quervernetzungsgrad aufweisen als die Hydrogele mit der 30%igen Lösung. Dafür scheinen die anderen Zusammensetzungen mit der Oligomer-Konzentration von 30 % dennoch eine höhere Stabilität in der inneren Gelstruktur zu haben, wie die anderen Charakterisierungsmethoden gezeigt haben. Dieser Unterschied ist erneut auf den erhöhten Anteil an nicht-reagierten Oligomeren bei der 60%-igen Lösung zurückzuführen, die die innere Gelstruktur stören könnten.

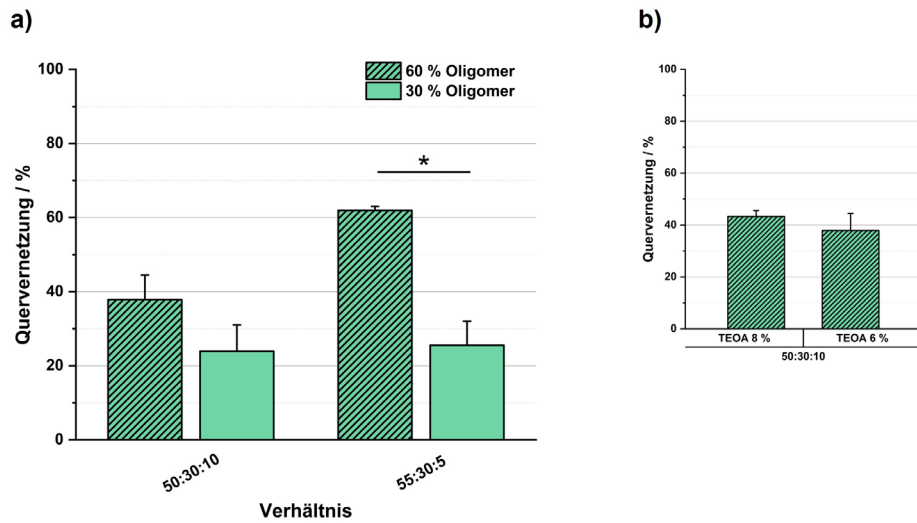


Abbildung 76: Charakterisierung der Hydrogel-Platten der Gelatine-Hydrogele, mit TEOA als Base, in Bezug auf den Quervernetzungsgrad (TNBS-Assay) und mit a) allen Verhältnissen und Oligomer-Konzentrationen und b) 50:30:10 als Verhältnis mit 60 % Oligomer-Lösung und dem Vergleich zwischen TEOA 8 % und TEOA 6 %. Verglichen wurden verschiedene Zusammensetzungen und Oligomer-Konzentrationen ($n=3$, $MW \pm SD$). Die statistische Analyse wurde mit dem Welch-t-Test durchgeführt (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ und * $p < 0,05$).

Den entscheidenden Faktor liefert die Bestimmung der Zellviabilität mit dem WST-8-Zellviabilitätsreagenz und den murinen embryonalen 3T3-Fibroblasten. In Abbildung 77 ist deutlich zu erkennen, dass die Hydrogele, bei beiden Oligomer-Konzentrationen, mit dem Verhältnis von 55:30:5 an Tag 7 eine höhere Zellviabilität zeigen, als die Hydrogele mit dem Verhältnis 50:30:10.

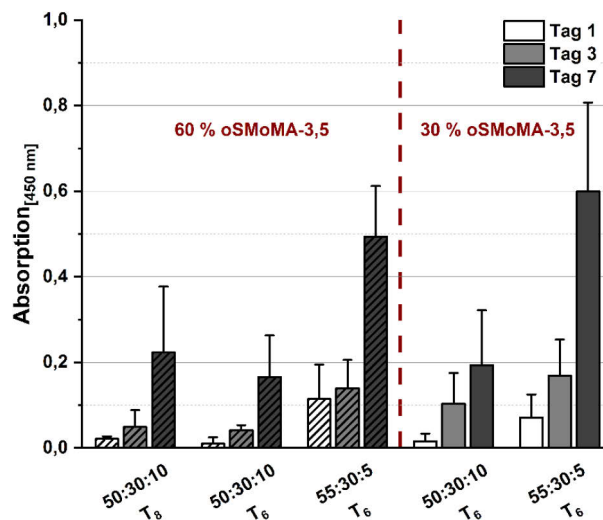


Abbildung 77: Zytokompatibilität der Gelatine-Hydrogele mit den 3T3-Fibroblasten, TEOA als Base und mit a) allen Verhältnissen und Oligomer-Konzentrationen und b) 50:30:10 als Verhältnis mit 60 % Oligomer-Lösung und dem Vergleich zwischen TEOA 8 % und TEOA 6 %. Verglichen wurden verschiedene Zusammensetzungen und Oligomer-Konzentrationen ($n=4$, $MW \pm SD$).

Dies ist wahrscheinlich auf die geringere DMSO-Konzentration zurückzuführen, die bei den Hydrogelen mit 55:30:5 vorhanden ist. Bei dem Verhältnis 50:30:10 macht das DMSO einen Anteil von 1/9 (11,11 %) aus, bei dem Verhältnis von 55:30:5 nur noch einen Anteil von 1/18 (5,56 %). Nguyen *et al.* berichteten von einer DMSO- Zytotoxizität bei einer Konzentration von 5 bis 10 %. In diesem Bereich wurde die Zellproliferation von vier verschiedenen Zelllinien stark eingeschränkt [90]. Bei Qi *et al.* lag der Wert, der schon zu Schäden bei Haarzellen führte, bei 0,5-6 % [91]. Entgegen den zuvor genannten Publikationen wurde bei He *et al.* DMSO in ähnlichen Konzentrationen verwendet und führte zu keiner starken Einschränkung der Zellproliferation. Sie stellten ein Konstrukt aus Gelatine, Alginat, Fibrin und aus dem Fettgewebe stammenden Stammzellen her und untersuchten die Lebensfähigkeit der Zellen nach der Zugabe eines Kryokonservierungsmittels (Glycerin und DMSO) in verschiedenen Konzentrationen. Dazu wurde ein Zellproliferations-Assay nach der Zugabe von 5 %, 10 % und 15 % DMSO-Zugabe durchgeführt. Die Werte nach der Zugabe des DMSOs zeigten immer niedrigere Werte als die Kontrolle ohne DMSO, es konnten aber bei der Zugabe von 5 % DMSO noch eine Zellviabilität von 73,21 % und für 10 % noch eine Zellviabilität von 60,23 % erreicht werden [92]. Aus dem Grund der oben genannten Zytotoxizität von DMSO und dem erhöhten Anteil von 5,56 % in den Gelatine-Hydrogelen wurden in dieser Arbeit zusätzliche Waschschriffe und Medienwechsel in den Herstellungsprozess der zellbeladenen Hydrogele eingebaut. Diese Schritte sollten das DMSO aus dem Hydrogel rauswaschen und für eine schnelle Verdünnung des DMSOs sorgen. Neben dem DMSO-Effekt zeigt sich auch eine leicht erhöhte Zellviabilität bei den Hydrogelen mit lediglich 30 % Oligomer-Lösung. Eine Vermutung könnte sein, dass ebenfalls das reaktive Oligomer einen negativen Effekt auf die Zellviabilität haben könnte. Dieser Effekt und die tatsächliche DMSO- Zytotoxizität auf die vorhandene Zelllinie wurden in Kapitel 4.8 überprüft. Aus den Experimenten der Charakterisierungsmethoden der Hydrogele aber insbesondere durch das Experiment zur Bestimmung der Zellviabilität, lässt sich schlussfolgern, dass das Hydrogel mit dem Verhältnis von 55:30:5 und 30 % Oligomer-Lösung die besten Ergebnisse lieferte, um als Biotinte weiterverwendet zu werden. Den größten Faktor zeigte dabei die Senkung der DMSO-Konzentration auf 5,56 % anstelle von 11,11 %.

Das ausgewählte Gelatine-Hydrogel zeigte die höchste Zellviabilität, gute Ergebnisse bei der Festigkeit des Hydrogels, dem Quervernetzungsgrad und dem Trockengewicht bzw. den herauslösbaren Anteilen, sodass von einem stabilen Hydrogel ausgegangen werden konnte.

4.5.1.3 Variation im Lösungsmittel

Bevor es zu der Überlegung mit der Verwendung des Hydrogels als Biotinte kam, wurde die Gelatine in demineralisiertem Wasser [30] und die ältere Generation an Oligomer häufig in DMF statt DMSO gelöst [93]. Diese Kombinationen erforderten eine Vorfabrikierung der Hydrogel-Platten und waren nicht für die direkte Einbettung der Zellen geeignet. Im Vergleich zu anderen Lösungsmitteln wie Aceton, Ethanol und DMSO, zeigt DMF den höchsten toxischen Effekt, welcher schon bei 0,1 % Konzentration im finalen Medium auftritt [94]. Für das Auflösen des Oligomers müssen Lösungsmittel wie die oben genannten verwendet werden, da das Auflösen des Oligomers in rein wässrigem Lösungsmittel bereits zu der Hydrolyse der intakten Anhydrid-Einheiten führen könnte [30]. Die Zellen benötigen für das Wachstum ein geeignetes Nährmedium, das die Quelle von Aminosäuren, Vitaminen, anorganischen Salzen, Glukose und Serum darstellt. Zudem sorgt das Nährmedium, wie DMEM, für die Aufrechterhaltung des pH-Wertes und der Osmolarität. Demineralisiertes Wasser kann nicht als Lieferant für die benötigten Faktoren angesehen werden [95]. In diesem Versuchsteil sollten die Hydrogele dennoch auf ihre Eigenschaften überprüft und mit der neuen Variante (DMEM/H₂O und DMSO als Lösungsmittel für das Oligomer) verglichen werden. Durch die vorliegende bekannte Zytotoxizität und Abwesenheit eines Nährmediums wurde auf die Versuche zur Zellkompatibilität verzichtet. Die untersuchten Hydrogele wurden mit einem Verhältnis von 55:30:5, 30 % Oligomer (oSMoMA-3,5) in DMSO oder DMF und TEOA 6 % bzw. K₂HPO₄ 10 % als Base hergestellt. Bei der Gelatine-Lösung wurde einmal die in Kapitel 4.6.1 beschriebene Variante mit der Kombination aus DMEM und demineralisiertem Wasser (1:2) und einmal nur demineralisiertem Wasser als Lösungsmittel getestet (Abbildung 78).

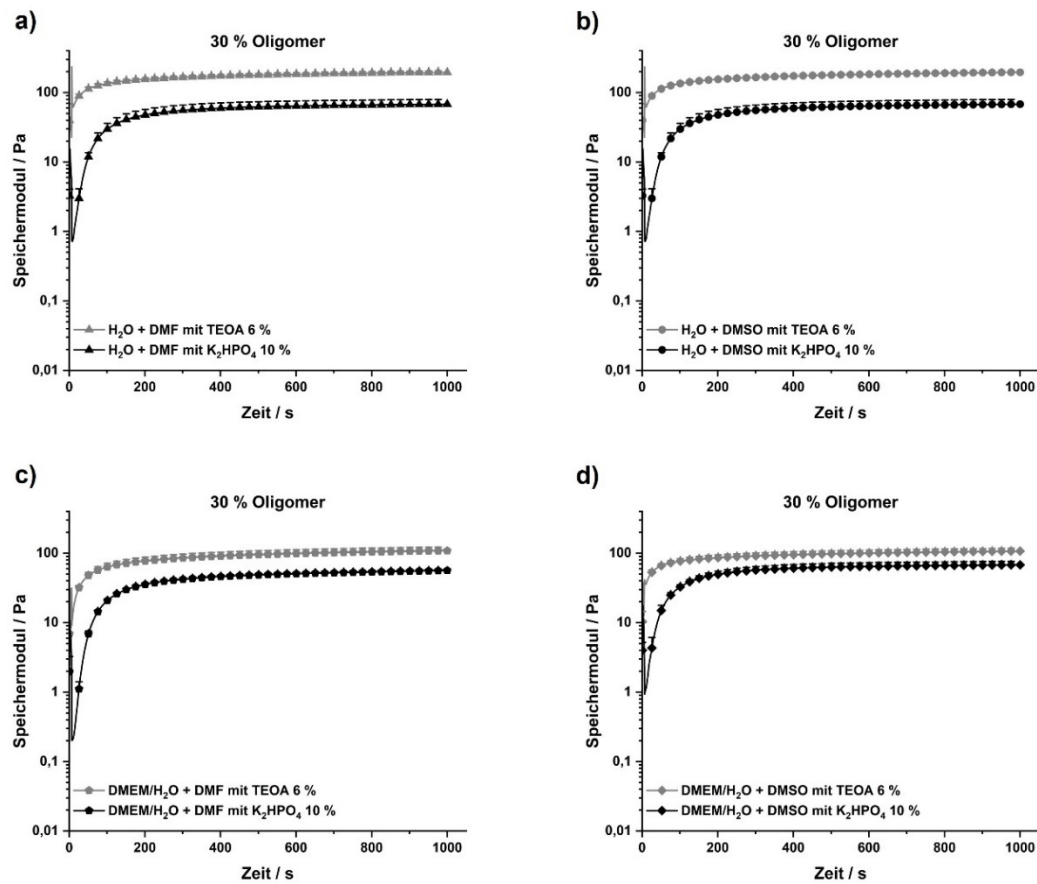


Abbildung 78: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik der Gelatine-Hydrogele, mit TEOA 6 % (grau) und K_2HPO_4 10 % (schwarz) als Base, anhand des Speichermoduls (G') mit a) H_2O und DMF, b) H_2O und DMSO, c) DMEM/ H_2O und DMF und d) DMEM/ H_2O und DMSO. Verglichen wurden verschiedene Gelatine-Hydrogele mit H_2O oder DMEM/ H_2O als Lösungsmittel für die Gelatine und DMF oder DMSO als Lösungsmittel für das Oligomer oSMoMA-3,5 ($n=3$, $MW \pm SD$).

Durch die Abbildungen 78 und 79 wird klar, dass die Hydrogele, die nur mit demineralisiertem Wasser hergestellt worden sind, zu einem höheren Speichermodul (G') und somit zu einer höheren Festigkeit der Hydrogele führen, wie auch in Kapitel 4.6 bei der Entwicklung der Biotinten beschrieben wird ist. Dabei ist der Effekt bei TEOA 6 % (grau) als Base deutlicher als mit K_2HPO_4 10 % (schwarz) als Base. Bei den Hydrogelen mit DMEM/ H_2O als Lösungsmittel für die Gelatine, zeigt sich in der Gelierungskinetik kein Unterschied zwischen DMSO und DMF als Lösungsmittel für das Oligomer. Bei reinem demineralisiertem Wasser hingegen führt DMSO sogar zu den festeren Hydrogelen. Das bedeutet die Kombination aus demineralisiertem Wasser und DMSO führt hier zu besseren Ergebnissen als demineralisiertem Wasser und DMF.

Bei den Hydrogelen, die demineralisiertem Wasser als Lösungsmittel für die Gelatine enthalten, sind keine störenden Faktoren, wie zum Beispiel Aminosäuren oder Salzen enthalten, die die Gelierungsreaktion stören können. Aus diesem Grund führt die Reaktion zu Hydrogelen mit einer höheren Festigkeit.

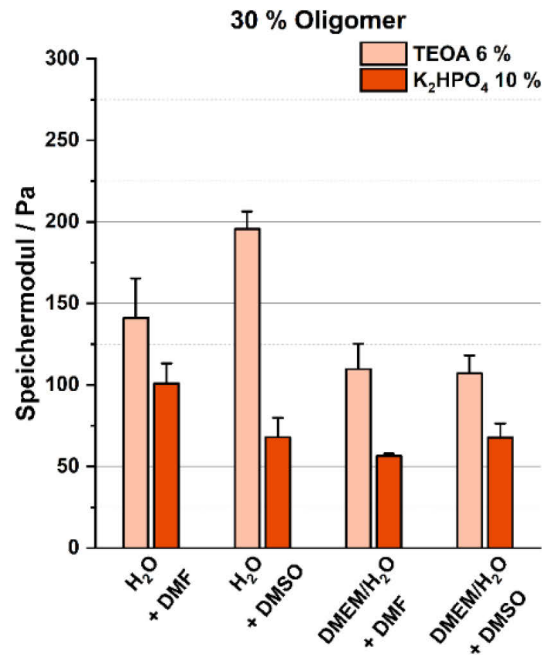


Abbildung 79: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik der Gelatine-Hydrogele, mit beiden Basen (TEOA 6 % und K₂HPO₄ 10 %), anhand des Speichermoduls (G') bei 1000 Sekunden. Verglichen wurden verschiedene Gelatine-Hydrogele mit H₂O oder DMEM/H₂O als Lösungsmittel für die Gelatine und DMF oder DMSO als Lösungsmittel für das Oligomer oSMoMA-3,5 ($n=3$, MW $\pm$ SD).

Bei der Betrachtung des Speichermoduls (G') für die Festigkeit der vorfabrizierten Hydrogel-Platten beim Frequenztest (Abbildung 80) fällt auf, dass auch hier reines demineralisiertem Wasser als Lösungsmittel für die Gelatine zu den festeren Hydrogelen führt. Bei der Wahl der Base gibt es keine klare Tendenz, da es sich unter den jeweiligen Hydrogelen stark unterscheidet. Die beiden Hydrogele mit DMSO als Lösungsmittel für das Oligomer, liegen unter denen, die mit DMF hergestellt worden sind, wie auch der Quervernetzungsgrad zeigt.

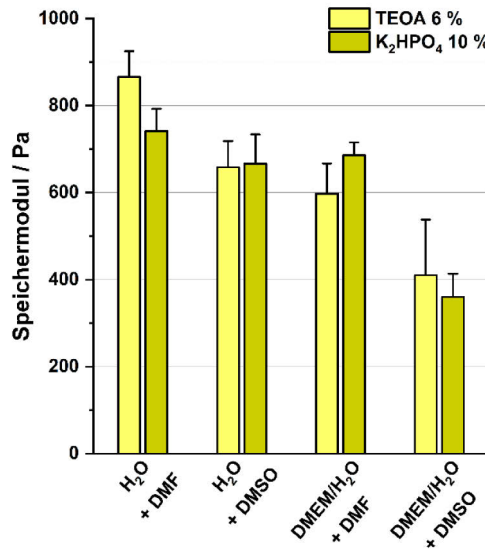


Abbildung 80: Rheologische Charakterisierung (Frequenztest) der kleinen Hydrogel-Platten der Gelatine-Hydrogele, mit beiden Basen (TEOA 6 % und K₂HPO₄ 10 %), anhand des Speichermoduls (G') bei 1 Hz. Verglichen wurden verschiedene Gelatine-Hydrogele mit H₂O oder DMEM/H₂O als Lösungsmittel für die Gelatine und DMF oder DMSO als Lösungsmittel für das Oligomer oSMoMA-3,5 (n=3, MW ± SD).

Bei dem Trockengewicht und den herauslösbaren Anteilen liegen alle Hydrogele sehr nah beieinander, wie Abbildung 81 zeigt. Was sich aber herausstellen lässt, ist, dass die Hydrogele mit K₂HPO₄ 10 % als Base zu den stabileren Hydrogelen mit höherem Trockengewicht und deutlich niedrigerem Anteil an herauslösbaren Anteilen führen.

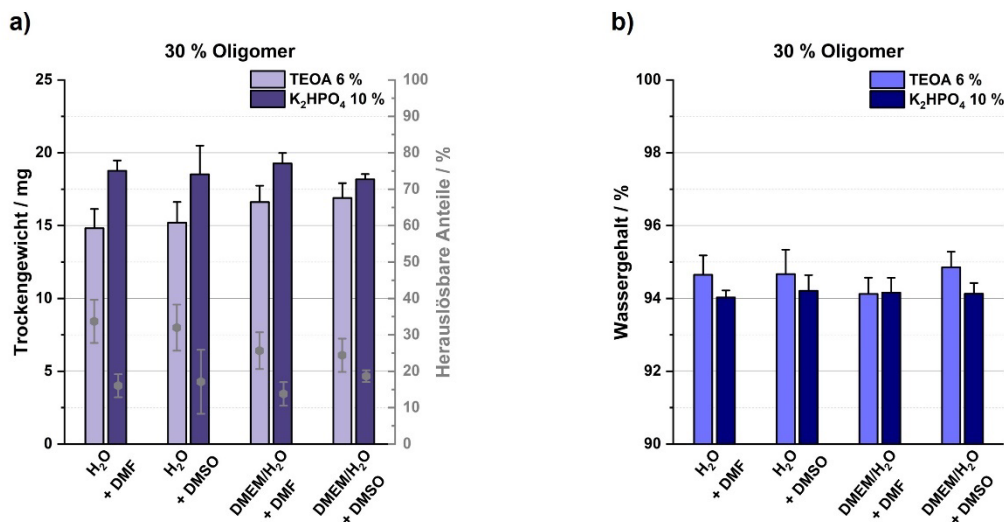


Abbildung 81: Physikochemische Charakterisierung der Hydrogel-Platten der Gelatine-Hydrogele über a) das Trockengewicht (mg) und die herauslösbaren Anteile (%) und b) den Wassergehalt (%) mit jeweils beiden Basen (TEOA 6 % und K₂HPO₄ 10 %). Verglichen wurden verschiedene Gelatine-Hydrogele mit H₂O oder DMEM/H₂O als Lösungsmittel für die Gelatine und DMF oder DMSO als Lösungsmittel für das Oligomer oSMoMA-3,5 (n=3, MW ± SD).

Die Kombination aus demineralisiertem Wasser und DMF scheint für K_2HPO_4 10 % am besten zu funktionieren. Der Wassergehalt liegt dabei aber leicht unter denen der Hydrogele mit TEOA 6 % als Base, sodass durch den höheren Quervernetzungsgrad weniger Wasser in dem Hydrogel-Netzwerk aufgenommen werden kann. Der Quervernetzungsgrad, der mit dem TNBS-Assay bestimmt worden ist, ist hingegen bei den Hydrogelen mit DMF als Lösungsmittel, unabhängig von dem Lösungsmittel der Gelatine, am höchsten (Abbildung 82). Ansonsten liegen alle Hydrogele, ausgenommen dem Hydrogel mit demineralisiertem Wasser und DMSO als Lösungsmittel für das Oligomer, in einem ähnlichen Bereich. Eine Tendenz, welche Base hier zu einer besseren Quervernetzung führt, kann hieraus nicht bestimmt werden.

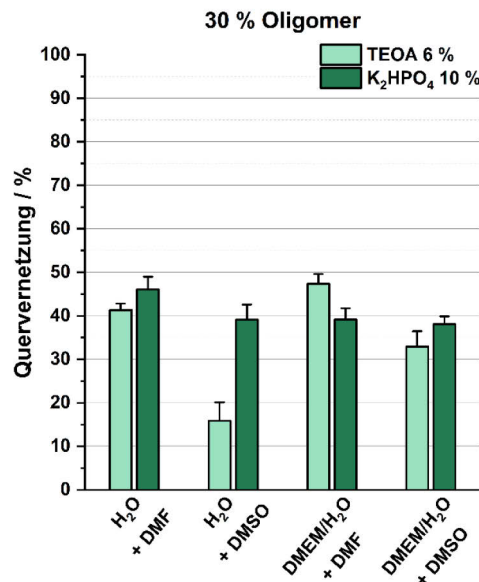


Abbildung 82: Charakterisierung der Hydrogel-Platten der Gelatine-Hydrogele in Bezug auf den Quervernetzungsgrad der Gelatine (TNBS-Assay) mit beiden Basen (TEOA 6 % und K_2HPO_4 10 %). Verglichen wurden verschiedene Gelatine-Hydrogele mit H₂O oder DMEM/H₂O als Lösungsmittel für die Gelatine und DMF oder DMSO als Lösungsmittel für das Oligomer oSMoMA-3,5 ($n=3$, MW $\pm$ SD).

Die Variation in der Art des Lösungsmittels für die Gelatine und für das Oligomer wurden durchgeführt, um die Eigenschaften der Hydrogele zu betrachten, die nach älteren Herstellungsmethoden entstanden sind. Da das Ziel dieser Arbeit die Entwicklung einer Biotinte war und, wie oben genannt, die Varianten mit reinem demineralisiertem Wasser für die Gelatine und DMF für die Lösung des Oligomers ungeeignet dafür sind, kann auf die abschließende Beurteilung der Eignung als Biotinte verzichtet werden. Betrachtet man die Lösungsmittel für das Oligomer mit DMF und DMSO, führte auch das DMF in Bezug auf den Quervernetzungsgrad (TNBS-Assay) und dem Frequenztest der Hydrogel-Platten zu leicht verbesserten Ergebnissen im Gegensatz zu DMSO als Lösungsmittel. Bei DMSO und DMF handelt es sich bei beiden um aprotische polare Lösungsmittel mit sehr ähnlichen Eigenschaften. Die beiden Dipolmomente, die ein Maß für die Polarität und damit Mischbarkeit für Wasser darstellen könnten, liegen mit Werten von 3,9 (DMSO) und 3,86 (DMF) zu nah beieinander, um damit Schlüsse zur verbesserten Mischbarkeit mit dem demineralisierten Wasser ziehen zu können [96]. Ein Aspekt für die Begründung der Unterschiede könnte die eventuell bessere Löslichkeit des Oligomers in DMF sein, das spiegelte sich aber nicht in den Ergebnissen der Gelierungskinetik wider. Insgesamt lässt sich sagen, dass DMF gut gegen das weniger toxische DMSO ausgetauscht werden kann. Bei dem Vergleich des Lösungsmittels für die Gelatine von der Mischung DMSO/H₂O gegenüber dem reinen demineralisierten Wasser lassen sich lediglich Unterschiede in der Gelierungskinetik und der resultierenden Festigkeit der Hydrogel-Platten erkennen. Die physikochemischen Eigenschaften und der Quervernetzungsgrad lassen keine Nachteile der Mischung DMEM/H₂O im Vergleich zu reinem demineralisiertem Wasser erkennen. Im Gegensatz zu DMEM enthält H₂O eine Vielzahl von Aminosäuren, Vitaminen, Glukose und Salzen [97], die die Interaktion der Gelatine mit dem Quervernetzer oSMoMA-x und damit die Gelierung beeinflussen können. Ein möglicher Grund für die Unterschiede, die bei den verschiedenen Analysemethoden beobachtet wurden, könnten die intermolekularen Wechselwirkungen im Hydrogel sein, die ohne die Zugabe von DMEM bei reinem demineralisiertem Wasser stärker ausgeprägt sind. Neben der Quervernetzung durch die Amin-Anhydrid-Konjugation spielen auch intermolekulare Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen und

hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Komponenten eine Rolle. Diese Wechselwirkungen können die Festigkeit des Hydrogels unmittelbar nach der Herstellung und bei den Hydrogel-Platten erhöhen. Obwohl diese intermolekularen Wechselwirkungen zu einer erhöhten Festigkeit bei der Gelierungskinetik und Festigkeit der Hydrogel-Platten führten, zeigten sie aufgrund der gleichen Menge an Komponenten und der gleichen Anzahl an Quervernetzungen keinen Unterschied im Quervernetzungsgrad und den physikochemischen Eigenschaften wie dem Trockengewicht. Aus diesem Grund kann auch die Mischung von DMEM/H₂O gut als Alternative für reines demineralisiertes Wasser genutzt werden.

4.5.1.4 Zusammenfassung

Bei der Variation in der Zusammensetzung des Gelatine-Hydrogels wurden drei verschiedene Aspekte betrachtet. Zum einen die Art des Oligomers und das Verhältnis der Komponenten zueinander und zum anderen das Lösungsmittel für die Gelatine und das Oligomer. Bei der Art des Oligomers, wo das Verhältnis von 55:30:5 und die 30%ige Oligomer-Lösung gewählt wurden, lässt sich feststellen, dass der MA-Gehalt des verwendeten Oligomers einen großen Einfluss auf die resultierenden Eigenschaften des Hydrogels hat. oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10 zeigten hier in Bezug auf die Festigkeit und der Quervernetzungsreaktion oft die besten Ergebnisse mussten aber, wie Abbildung 58 zeigt, kritisch betrachtet werden, da es zur Präzipitation bei der Herstellung kam, was für eine inhomogene Zusammensetzung des Hydrogels sprach. Den bedeutendsten Faktor für die Verwendung als spätere Biotinte stellte die Zellviabilität dar. Neben den physikalischen Aspekten, die eine Biotinte ausweisen sollte, wie passende Gelierungseigenschaften und einer verfestigenden Morphologie, müssen sie den Zellen physiologisch eine geeignete Mikroumgebung bieten, um verschiedene Zellaktivitäten wie Migration, Proliferation, Differenzierung und Gewebeformung zu ermöglichen [98]. Die höchste Zellviabilität zeigten die Oligomere unter dem MA-Gehalt von oSMoMA-4. Da oSMoMA-3,5 die erforderliche Zellviabilität und zusätzlich gute Eigenschaften bei der Festigkeit des Hydrogels und dem Quervernetzungsgrad zeigte, wurde oSMoMA-3,5 für alle Versuche in Richtung Entwicklung der Biotinte und 3D-Druck ausgewählt. Die Versuche mit der Variation in den Verhältnissen der Zusammensetzung verglichen die ursprüngliche

Zusammensetzung mit 50:30:10 als Verhältnis und 60 % als Oligomer-Lösung mit der weiterentwickelten Zusammensetzung mit 55:30:5 als Verhältnis und 30 % Oligomer-Lösung. Besonders die Reduzierung von DMSO auf 5,56 % aber zusätzlich auch an Oligomer und Base führten zu einer Zusammensetzung, die weniger Zytotoxizität zeigte. Da die weiterentwickelte Variante oft die besten Ergebnisse zeigte, wurde aufgrund der geringeren Zytotoxizität diese Variante für weitere Versuche ausgewählt. Der letzte Teil der Versuchsreihe beschäftigte sich mit der Variation der Lösungsmittel für die Gelatine und das Oligomer. In diesem Teil ging es darum die Varianten zu betrachten, die aufgrund ihrer Zytotoxizität für die Wahl als Biotinte ausgeschlossen worden sind, aber früher für vorfabrizierte Hydrogele ohne Einbettung der Zellen oft genutzt wurden. Dafür wurde zum einen die Gelatine nur in reinem demineralisiertem Wasser gelöst, was die Einbettung der Zellen ohne vorhandenes Nährmedium erschweren würde, und zum anderen das Oligomer in dem toxischeren DMF statt in DMSO gelöst. Die Ergebnisse zeigten, dass die Hydrogele mit demineralisiertem Wasser oft zu den festeren Hydrogelen führten, verglichen zu den Hydrogelen, wo DMEM mit inkludiert war. Aus den oben genannten Gründen wurde diese Variante aber für die Entwicklung einer Biotinte ausgeschlossen. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass das Verhältnis von 55:30:5 und die 30%ige Lösung von oSMoMA-3,5 in DMSO zu Hydrogelen mit sehr guten Eigenschaften und einer guten Zellviabilität führten. Wie schon erwähnt, sollen Biomaterialien für das Tissue-Engineering die Zellen unterstützen und die EZM nachahmen. Hydrogele auf Gelatine-Basis können die Zelladhäsion und -proliferation bieten. Zudem ist Gelatine biologisch abbaubar und stellt eine Grundlage der EZM dar. Aufgrund der vielversprechenden Eigenschaften erfolgte die Zulassung der FDA eines kommerziellen Produktes auf der Gelatine-Basis mit dem Namen Gelfoam® [99]. Gelfoam® ist ein Schwamm auf Gelatine-Basis, der zur Blutstillung und Wundbehandlung während und nach chirurgischen Eingriffen verwendet wird [100]. Das Vorhandensein eines kommerziellen Produktes auf Gelatine-Basis verdeutlicht die hohe Bedeutung der Gelatine-Hydrogele und stellt einen vielversprechenden Ansatz dar.

4.5.2 Imagel®-Hydrogele

Bei der Herstellung der Imagel®-Hydrogele wurde die Konzentration an Imagel® mit 37,5 % in demineralisiertem Wasser für alle Versuche beibehalten. Die anderen Komponenten wurden in Art, Konzentration oder Art des Lösungsmittels verändert und die Eigenschaften, wenn möglich, auf die Gelierungskinetik, Trockengewicht, herauslösbare Anteile und Wassergehalt untersucht. Da die Imagel®-Hydrogele auf Grundlage von Krieghoff *et al.* [20] lediglich für die Vorversuche des 3D-Druckes dienen sollten und der Fokus für die Entwicklung der Biotinte auf den Gelatine-Hydrogelen lag, wurde hier auf Versuche zur Zellviabilität und dem Quervernetzungsgrad (TNBS-Assay) verzichtet.

4.5.2.1 Variation in der Basen-Konzentration

Bei diesem Versuchsteil wurden verschiedene Basen-Konzentrationen der Ausgangslösung (NMPO) von 1040 mM bis 2500 mM mit oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10 (7 % Oligomer-Konzentration) getestet. Abbildung 83 zeigt, dass es bei oSMoMA-10 im Vergleich zu oSMoMA-7,5 in der Gelierungskinetik zu höheren Speichermodulen (G') und aus diesem Grund zu höheren Festigkeiten der Hydrogele kommt. Das lässt darauf schließen, dass es bei oSMoMA-10 durch höheren MA-Gehalt zu mehr Amin-Anhydrid-Konjugationen mit dem Imagel® kommt, die zu einer besseren Quervernetzungsreaktion führen. Bei beiden Oligomeren erhöht sich die Festigkeit des Hydrogels auch mit erhöhter Basen-Konzentration. Das zeigt, dass die verbesserte Quervernetzung durch die Amin-Anhydrid-Konjugation in diesem Fall eine erhöhte Basen-Konzentration benötigt, um mehr Protonen, die stören könnten, während der Reaktion abzufangen. Aus diesem Grund wurde hier die Base NMPO als Protonenfänger ergänzt. Oligomere mit einem MA-Gehalt unter 7,5 bzw. oSMoMA-5 führten zu keiner ausreichenden Gelierung, sodass sich hier auf oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10 fokussiert wurde. Verglichen zu den Gelatine-Hydrogelen benötigte das Imagel®-Hydrogel Oligomere mit höherem MA-Gehalt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es sich bei Imagel® um partiell hydrolysierte Proteine des Kollagens [93] handelt, die durch kürzere Ketten mehr Verknüpfungsstellen mit den Anhydriden brauchen, um zu einer ausreichenden Gelierung zu führen.

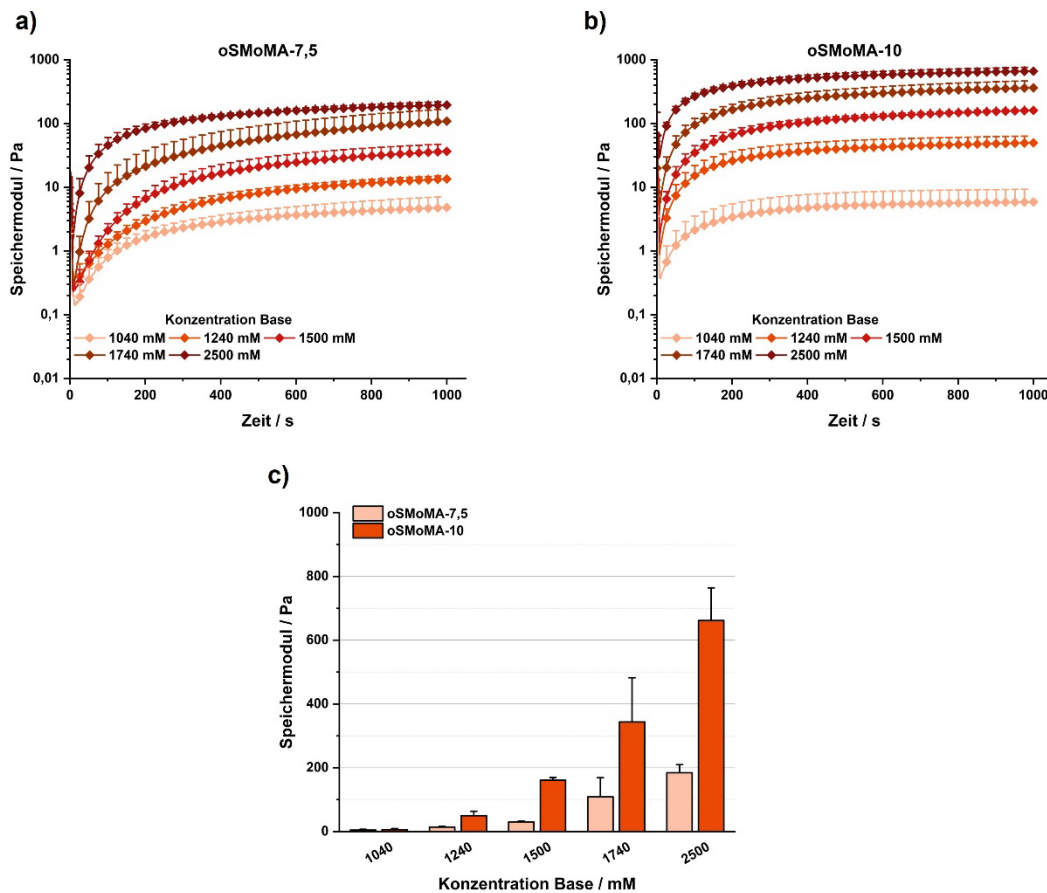


Abbildung 83: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik der Image®-Hydrogele anhand des Speichermoduls (G') mit a) oSMoMA-7,5, b) oSMoMA-10 und c) des Speichermoduls (G') bei 1000 Sekunden und mit beiden Oligomeren (oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10). Verglichen wurden verschiedene Basen-Konzentrationen von 1040 mM bis 2500 mM ($n=3$, $MW \pm SD$).

Abbildung 84 zeigt die physikochemischen Eigenschaften mit verschiedenen Basen-Konzentrationen. Bei oSMoMA-10 steigt das Trockengewicht leicht mit erhöhter Basen-Konzentration und die herauslösbaren Anteile sinken. Bei oSMoMA-7,5 ist dieser Trend nicht erkennbar. Der Wassergehalt hingegen sinkt mit steigender Basen-Konzentration bei beiden Oligomeren, wobei oSMoMA-10 im Vergleich zu oSMoMA-7,5 bei jeder Basen-Konzentration einen höheren Wassergehalt zeigt. Das heißt die Hydrogele auf der Basis von oSMoMA-10 können bei Rehydratation eine größere Menge an Wasser aufnehmen und zeigen einen höheren Schwellungsgrad. Wie Peppas *et al.* schon berichteten, handelt es sich bei Hydrogelen um dreidimensionale, hydrophile Polymernetzwerke, die große Mengen an Wasser oder biologischen Flüssigkeiten aufnehmen und absorbieren können.

Der hohe Wassergehalt und die weiche Konsistenz sind dabei von großer Bedeutung für die Ähnlichkeit zu natürlich lebenden Geweben. Ein hoher Wassergehalt spricht dabei für einen hohen Schwellungsrad [101].

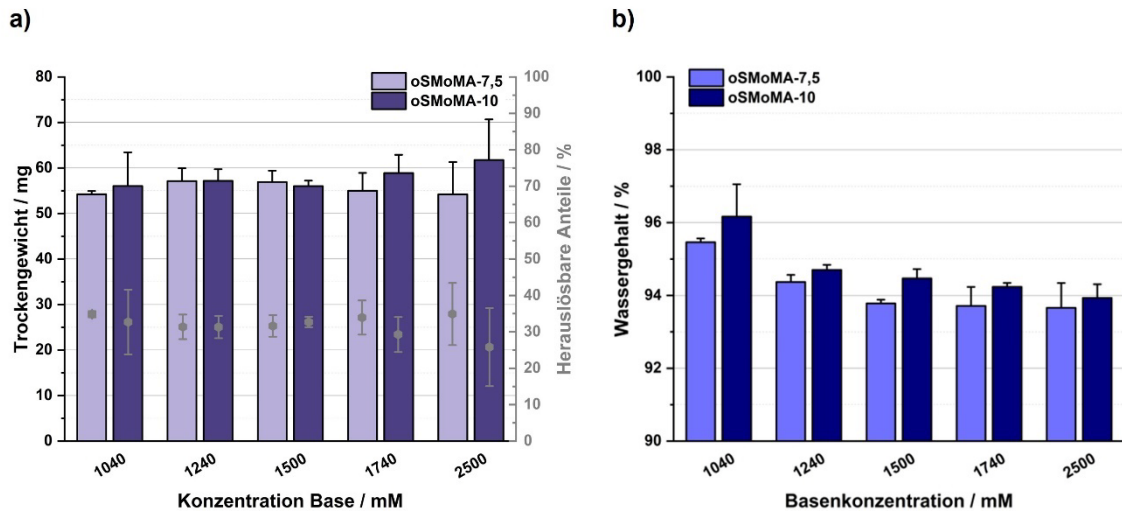


Abbildung 84: Physikochemische Charakterisierung der Hydrogel-Platten der Imager®-Hydrogele über a) das Trockengewicht (mg) und die herauslösbaren Anteile (%) und b) den Wassergehalt (%) mit jeweils beiden Oligomeren (oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10). Verglichen wurden verschiedene Basen-Konzentrationen von 1040 mM bis 2500 mM (n=3, MW $\pm$ SD).

4.5.2.2 Variation in der Art des Oligomers

Bei der Variation der Art des Oligomers wurde bei allen Hydrogelen eine Basen-Konzentration von 1500 mM verwendet. Getestet wurden die Oligomere oSMoMA-5, oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10 mit einer Konzentration von 7 % und eine Blindprobe, die nur DMSO enthielt. . Wie man in Abbildung 85 deutlich erkennen kann, nimmt der Speichermodul (G') und damit auch die Festigkeit des Hydrogels mit erhöhtem MA-Gehalt des Oligomers zu. oSMoMA-10 zeigt stark erhöhte Werte im Gegensatz zu den beiden anderen Oligomeren aufgrund der erhöhten Anzahl an Anhydrid-Gruppen. oSMoMA-5 und oSMoMA-7,5 liegen bei sehr eng beieinander, wobei oSMoMA-7,5 im Vergleich den höheren Wert zeigt. Alle drei Oligomere zeigen im Vergleich zu der Probe mit reinem Lösungsmittel erhöhte Speichermoduli (G'). Eine erhöhte Anzahl an Anhydrid-Gruppen sorgt für eine erhöhte Quervernetzung direkt nach der Herstellung der Hydrogele. Wichtig ist dabei auch die Abfolge der MA-Gruppen im Oligomer, die von der Anordnung her optimal zu dem natürlichen Biopolymer passen muss. Im Gegensatz zu den Gelatine-Hydrogelen gibt es hier kein Optimum, das bei einem bestimmten MA-Gehalt liegt und aus der Reihe mit ansteigendem MA-Gehalt rausfällt.

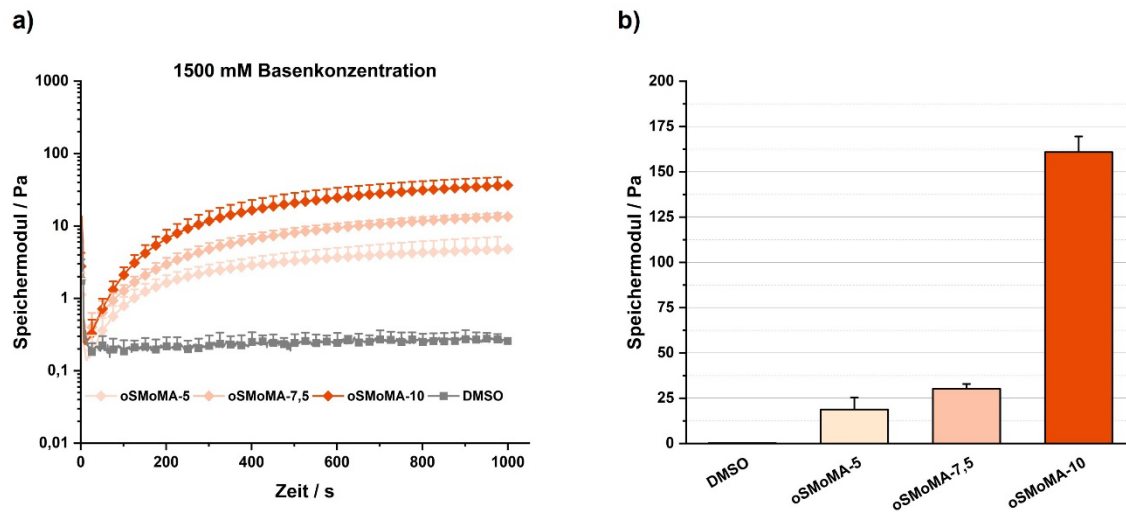


Abbildung 85: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik der Image®-Hydrogele anhand des Speichermoduls (G') mit a) allen drei Oligomeren und b) des Speichermoduls (G') bei 1000 Sekunden und mit allen drei Oligomeren. Verglichen wurden bei einer Basen-Konzentration von 1500 mM oSMoMA-5, oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10 und reines DMSO als Blindprobe ($n=3$, MW $\pm$ SD).

Bei dem Trockengewicht wiederum liegen die Hydrogele von allen Oligomeren sehr eng beieinander. Die steigende Tendenz für das Trockengewicht und die sinkende Tendenz für die herauslösbaren Anteile kann man erahnen, wobei kein direkter Unterschied zwischen oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10 zu erkennen ist (Abbildung 86).

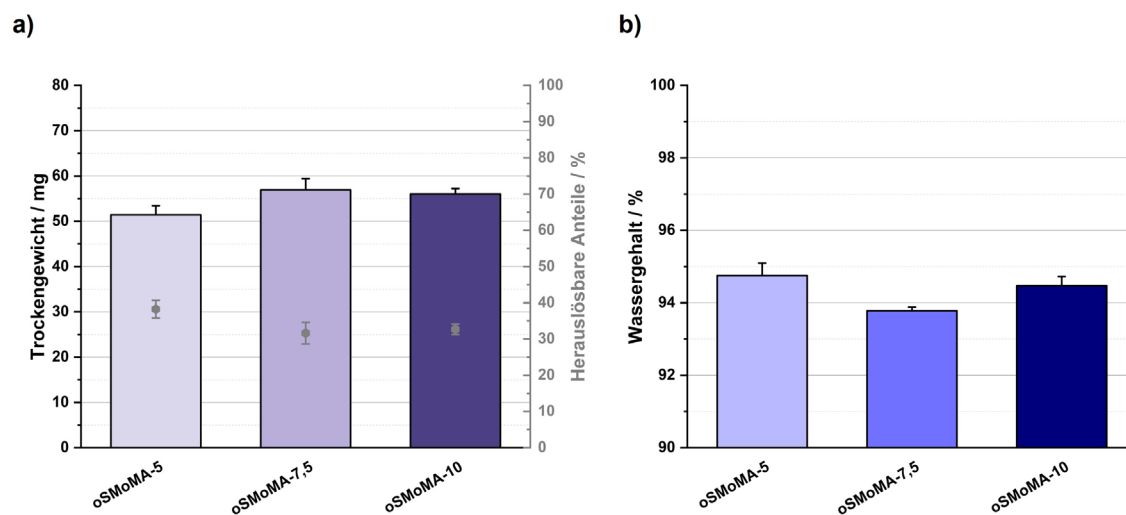


Abbildung 86: Physikochemische Charakterisierung der kleinen Hydrogel-Platten der Image®-Hydrogele über a) das Trockengewicht (mg) und die herauslösbaren Anteile (%) und b) den Wassergehalt (%) mit jeweils allen drei Oligomeren. Verglichen wurden bei einer Basen-Konzentration von 1500 mM oSMoMA-5, oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10 ($n=3$, MW $\pm$ SD).

Den niedrigsten Wassergehalt zeigt oSMoMA-7,5, wobei aber alle Oligomere zwischen 93 bis 95 % liegen (Abbildung 86). Fasst man die Ergebnisse zusammen, zeigen die Hydrogele mit oSMoMA-10 bei einer Basen-Konzentration von 1500 mM die besten Ergebnisse.

4.5.2.3 Variation in der Art des Lösungsmittels

In diesem Versuchsteil wurden DMSO und DMF als Lösungsmittel für oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10 (7 % Oligomer-Konzentration) verglichen. Die Basen-Konzentration wurde auch hier bei 1500 mM beibehalten. Abbildung 87 zeigt, wie schon in Kapitel 4.5.2.2 beschrieben, dass oSMoMA-10 im Gegensatz zu oSMoMA-7,5 ein erhöhten Speichermodul (G') zeigt. Dies ist auch für beide Lösungsmittel, die hier getestet wurden, der Fall. Dennoch wird deutlich, dass die Hydrogele, die mit DMF als Lösungsmittel für das Oligomer hergestellt worden sind (orange), bei beiden Oligomeren zu einer erhöhten Festigkeit des Hydrogels direkt nach der Herstellung führen. Am deutlichsten ist der Unterschied für beide Lösungsmittel bei oSMoMA10. Die Kombination aus oSMoMA-10 und DMF als Lösungsmittel führt zu einem Speichermodul (G') von etwa 2000 Pa. Zudem ist die Gelierung in der Zeit von 1000 Sekunden deutlich langsamer verglichen zu den anderen Kombinationen. Der Verlauf der Gelierung wird in diesem Fall von der Art des Lösungsmittels beeinflusst. Vergleicht man DMSO und DMF miteinander, handelt es sich bei DMSO um Lösungsmittel, das im Vergleich zu DMF etwas polarer ist. Aus diesem Grund kann das DMSO je nach Polarität des Hydrogelbildners stärkere Wechselwirkungen mit dem diesem eingehen, die zu einer beschleunigten Gelierung führen [80]. Bei beiden Oligomeren ist zu erkennen, dass das DMSO im Vergleich zu dem DMF eine beschleunigte Gelierung bis zu einem Plateau zeigt. Besonders ausgeprägt ist der Unterschied in der Geschwindigkeit der Gelierung bei oSMoMA-10 mit DMF als Lösungsmittel. Dort findet eine sehr langsame Gelierung statt. Ein Grund dafür könnte die weniger starke Wechselwirkung von oSMoMA-10, aufgrund der erhöhten Anzahl an polaren Anhydrid-Gruppen, mit dem DMF sein.

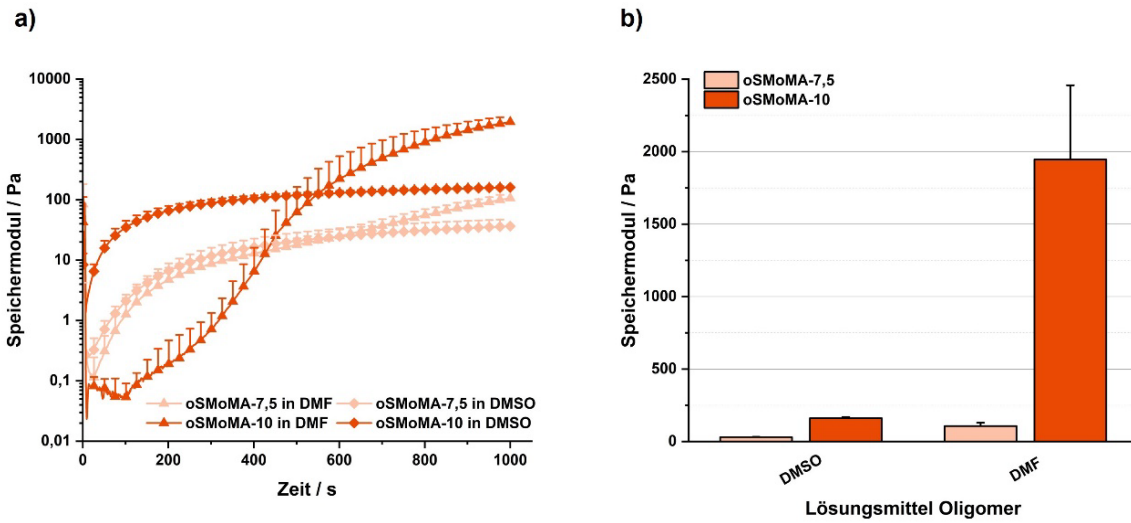


Abbildung 87: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik der Image®-Hydrogele anhand des Speichermoduls (G') mit a) DMSO oder DMF als Lösungsmittel und b) des Speichermoduls (G') bei 1000 Sekunden und mit DMSO oder DMF als Lösungsmittel. Verglichen wurden bei einer Basen-Konzentration von 1500 mM oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10 ($n=3$, $MW \pm SD$).

Dies spiegelt sich aber nicht in den Trockengewichten und herauslösbaren Anteilen wider (Abbildung 88). Hier liegt das Trockengewicht der Hydrogele mit DMF, für beide Oligomere, unter denen mit DMSO. Auch die Werte für die herauslösbaren Anteile liegen deutlich über den Hydrogelen, die mit DMSO als Lösungsmittel für das Oligomer hergestellt worden sind.

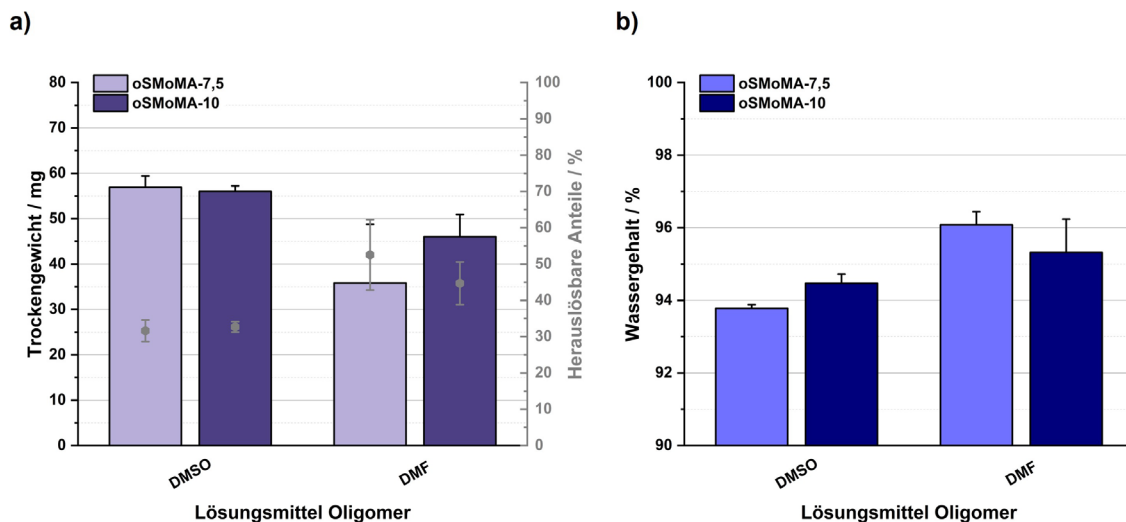


Abbildung 88: Physikochemische Charakterisierung der kleinen Hydrogel-Platten der Image®-Hydrogele über a) das Trockengewicht (mg) und die herauslösbaren Anteile (%) und b) den Wassergehalt (%) mit DMSO oder DMF als Lösungsmittel. Verglichen wurden bei einer Basen-Konzentration von 1500 mM oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10 ($n=3$, $MW \pm SD$).

Der Wassergehalt bei den Hydrogelen mit DMF ist auch deutlich über dem von den Hydrogelen mit DMSO und erreicht Werte von nahezu 96 %. Das zeigt, dass die Hydrogele mit DMF direkt nach der Herstellung eine höhere Festigkeit zeigen (Abbildung 87), aber über die Zeit ihre Stabilität verlieren, da die Hydrogele mit DMSO auch nach verschiedenen Trocknungs- und Waschschritten mit dem höheren Trockengewicht eine erhöhte Stabilität und einen geringeren Verlust an herauslösbaren Anteilen zeigen.

4.5.2.4 Zusätzliche Variationen

Bei den folgenden Variationen wurde nur die Gelierungskinetik am Oszillationsrheometer betrachtet und die resultierenden Speichermodule (G') verglichen. Die Basen-Konzentration von NMPO wurde konstant bei 1500 mM gehalten. Im ersten Teil der Versuchsreihe wurden oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10 (7 % Oligomer-Konzentration) einmal bei 22 °C und einmal bei 37 °C am Oszillationsrheometer vermessen, um zu beurteilen, welchen Einfluss der Temperaturunterschied bei den Messungen ausmacht. Dabei zeigte sich, dass die erhöhte Temperatur von 37 °C bei beiden Oligomeren einen negativen Einfluss auf die Festigkeit des Hydrogels hat. Wie Abbildung 89 zeigt, ist die Festigkeit des Hydrogels bei 22 °C höher als bei 37 °C. Auch Park *et al.* zeigten anhand von Gelatine-Methacryloyl-Gelen, dass eine Temperaturabhängigkeit, während der Quervernetzung und insbesondere in der Zeit besteht, in der das Hydrogel noch nicht komplett quervernetzt ist. Die Messung bei dieser Art von Hydrogelen zeigte deutliche Unterschiede zwischen 23 °C und 37 °C, wobei auch dort die festeren Hydrogele bei der niedrigeren Temperatur erreicht wurden. Bei einer erhöhten Temperatur sind die Moleküle, die für die Quervernetzung von Bedeutung sind, mehr in Bewegung und liegen nicht so nah beieinander [102]. Mit Hinblick auf die spätere Entwicklung einer Biotinte aus den Gelatine-Hydrogelen wurde dennoch bei allen Messungen für das Imager® eine Temperatur von 37 °C verwendet.

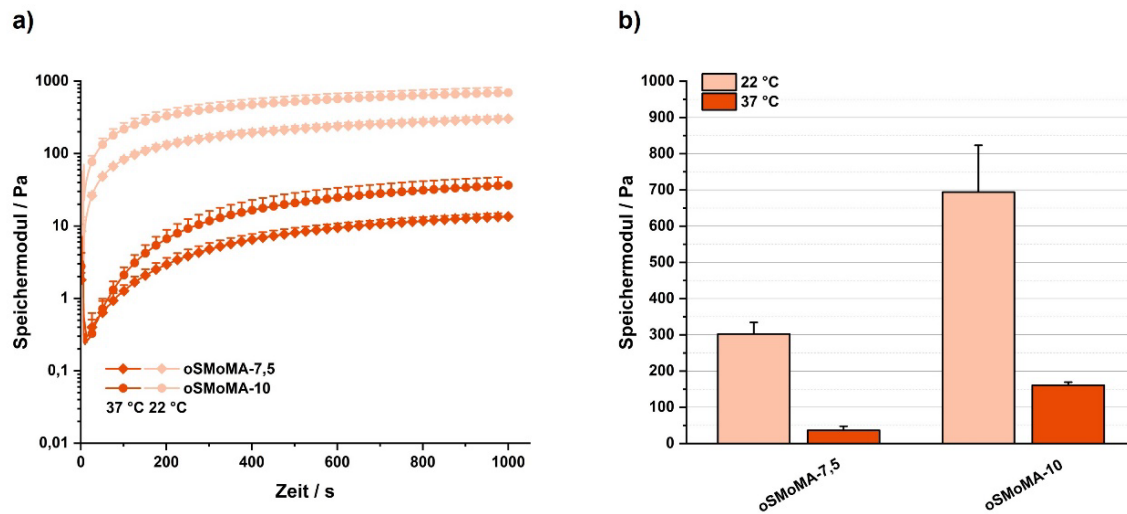


Abbildung 89: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik der ImageI®-Hydrogele anhand des Speichermoduls (G') mit a) 22 °C oder 37 °C und b) des Speichermoduls (G') bei 1000 Sekunden und mit 22 °C oder 37 °C. Verglichen wurden bei einer Basen-Konzentration von 1500 mM oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10 ($n=3$, $MW \pm SD$).

Im zweiten Teil dieses Kapitels wurde die Konzentration an Oligomer von 7 % auf 14 % erhöht. Wie oben genannt, wurde auch hier eine Basen-Konzentration von 1500 mM gewählt. Verglichen wurden hier die Oligomere oSMoMA-5, oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10. Die Abbildung 90 zeigt, dass eine Erhöhung der Oligomer-Konzentration bei keinem der Oligomere zu einem erhöhten Speichermodul (G') und somit zu einer erhöhten Festigkeit des Hydrogels führt. Die ursprünglich genutzt Konzentration an 7 % Oligomer in DMSO führt zu den Ergebnissen mit dem höheren Speichermodul (G') verglichen zu jeweils den 14%igen Lösungen. oSMoMA-10 zeigt dabei wie in den Versuchen zuvor die Ergebnisse mit der höchsten Festigkeit. Auch die Konzentration von 14 % liegt bei oSMoMA-10 über den Ergebnissen der anderen Oligomere mit 7 % Konzentration. Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass eine weitere alleinige Erhöhung der Konzentration bei jeglicher Art an Oligomer zu keiner verbesserten Quervernetzung der Hydrogele mit ImageI® führt. Die erhöhte Anzahl an MA-Gruppen ohne Variation in der Art des Oligomers führt schlussfolgernd zu keiner besseren Quervernetzung. Der optimale Abstand der MA-Gruppen muss, wie auch in 4.5.2.2 beschrieben worden ist, zu dem natürlichen Biopolymer passen.

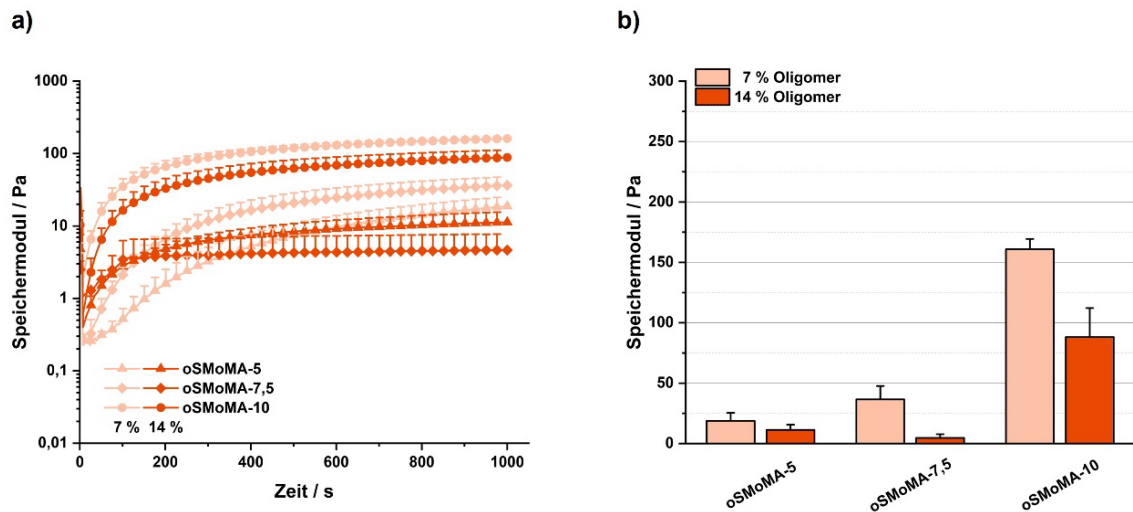


Abbildung 90: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik der ImageI®-Hydrogele anhand des Speichermoduls (G') mit a) 7 % oder 14 % Oligomer-Lösung und b) des Speichermoduls (G') bei 1000 Sekunden und mit 7 % oder 14 % Oligomer-Lösung. Verglichen wurden bei einer Basen-Konzentration von 1500 mM oSMoMA-5, oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10 ($n=3$, $MW \pm SD$).

Im letzten Versuch wurden neben DMSO und DMF noch andere Lösungsmittel für das Oligomer getestet. Dafür wurde oSMoMA-10 mit einer 7%igen Lösung des jeweiligen Lösungsmittels und eine Basen-Konzentration von 1500 mM ausgewählt. Bei Glycofurol, NBP und Glucosenon handelt es sich um andere Arten von Lösungsmitteln. Glycofurol ist ein ungiftiges Lösungsmittel, das bereits in pharmazeutischen Formulierungen als injizierbares Lösungsmittel verwendet wird [103]. Glucosenon und NBP gehören zu der Gruppe der „Green Solvents“. Aufgrund der hohen Polarität und Lösungsmöglichkeit für viele Stoffe werden dipolar aprotische Lösungsmittel wie DMSO und DMF sehr oft verwendet. Durch die schädlichen Auswirkungen auf die Gesundheit des Menschen und die Gefährdung der Umwelt wurde versucht eine neue Art von Lösungsmitteln zu finden, die diese Eigenschaften nicht aufweisen aber die gleiche Polarität zeigen [104]. Zum Beispiel wird Dihydrolevoglucosenon (Glucosenon) als biobasiertes Molekül in zwei Schritten aus Zellulose gewonnen [105]. Die Idee der Verwendung des Glycofurols und der „Green Solvents“ in diesem Experiment war, ob eventuell eine geringere Zytotoxizität der Lösungsmittel auf die Zellviabilität besteht. Dafür wurden die ursprünglich verwendeten Lösungsmittel durch die weniger schädlichen Lösungsmittel ersetzt und die Festigkeit direkt nach der Herstellung am Oszillationsrheometer untersucht. Diese blieb aber deutlich unter denen mit DMSO und DMF als Lösungsmittel, wie Abbildung 91 zeigt.

Eine Herstellung von Hydrogel-Platten war bei diesen Lösungsmitteln nicht möglich, sodass es nur eine kurze Stabilität direkt nach der Quervernetzungsreaktion gab. Auch wenn mit den durchgeführten Versuchen nicht abschließend geklärt werden konnte, weshalb der Speichermodul (G') so stark vom verwendeten Lösungsmittel abhängt, verdeutlichen die Versuche dennoch, dass die Wahl des Lösungsmittels die Gelierungskinetik sowie die Festigkeit der resultierenden Hydrogele beeinflusst. Mögliche Gründe hierfür könnten sein: (1) unterschiedliche Polarisierung der Aminofunktionen und Anhydride resultierend in veränderter Quervernetzung, (2) Solvatisierung der Amine (z.B. durch Wasserstoff-Brücken) und damit langsamere Quervernetzung, (3) unterschiedliche Einlagerung des Lösungsmittels in das Hydrogel-Gerüst, (4) Verunreinigungen der Lösungsmittel, die z.B. Einfluss auf den pH-Wert haben, (5) Veresterung der Anhydride mit dem Lösungsmittel (Glycofurol), (6) lösungsmittelabhängige Faltung des Imagels oder (7) Präzipitation einer Komponente und anschließende Messung eines heterogenen Systems.

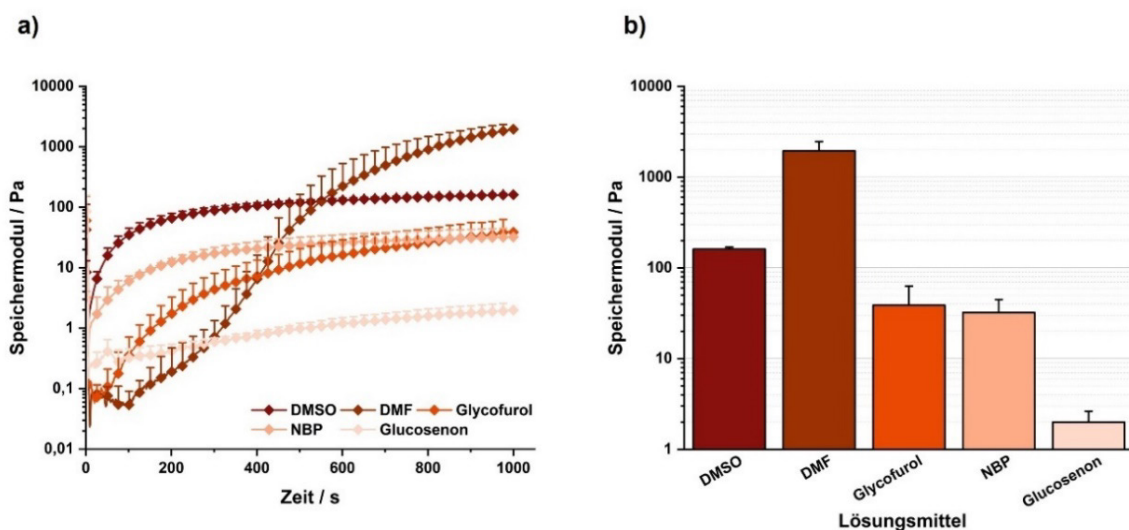


Abbildung 91: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik der Image[®]-Hydrogele anhand des Speichermoduls (G') mit a) einer Reihe an verschiedenen Lösungsmitteln und b) des Speichermoduls (G') bei 1000 Sekunden und mit einer Reihe an verschiedenen Lösungsmitteln. Verglichen wurden bei einer Basen-Konzentration von 1500 mM und oSMoMA-10 in einer 7%igen Lösung ($n=3$, $MW \pm SD$).

4.5.2.5 Zusammenfassung

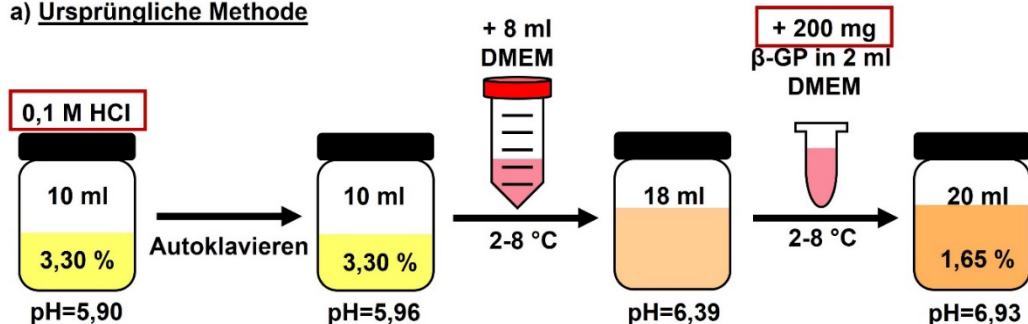
Bei den Variationen zu den Imagel®-Hydrogelen wurde in der Basen-Konzentration, in der Art des Oligomers, in der Art des Lösungsmittels für das Oligomer und in der Temperatur bei der Messung am Oszillationsrheometer beziehungsweise der Konzentration an Oligomer etwas geändert. Bei der Veränderung der Basen-Konzentration zeigte sich bei oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10 (7 %), dass sich die Festigkeit der Hydrogele mit steigender Basen-Konzentration erhöht. Dies ist darin begründet, dass die Hydrogele hier einen erhöhten Anteil an Protonenfängern für die Amin-Anhydrid-Konjugation in der Reaktion brauchen. Da die Imagel®-Hydrogele durch ihre Bestandteile, wie zum Beispiel der Base NMPO, aber zu zelltoxisch für den Gebrauch als Biotinte wären, wurden diese Hydrogele primär für die Vorversuche zum 3D-Druck verwendet. Neben der Festigkeit der Hydrogele spielte auch die Gelierungskinetik eine Rolle. In den ersten Druckversuchen zeigte sich, dass oSMoMA-7,5 und 1740 mM NMPO und oSMoMA-10 und 1500 mM am besten geeignet für diese Versuche waren. Bei der Variation in der Art des Oligomers wurde zusätzlich noch oSMoMA-5 (7 %) getestet. Oligomere mit einem MA-Gehalt von unter 5 ermöglichten keine Gelherstellung aufgrund von zu geringer Stabilität. Für die Versuche wurde eine mittlere Basen-Konzentration von 1500 mM ausgewählt. Hierbei zeigte sich, ähnlich zu den Versuchen mit der Variierung in der Basen-Konzentration, dass die Festigkeit der Hydrogele mit steigendem MA-Gehalt zunimmt. Das heißt auch hier werden für die Reaktion mehr Anhydrid-Gruppen in richtiger Anordnung benötigt, um zu einer besseren Quervernetzung zu führen. Die Variation in der Art des Lösungsmittels für das Oligomer wurde anhand von DMSO, DMF und einer Reihe an anderen weniger toxischen bzw. umweltfreundlicheren Lösungsmitteln getestet. Alle Lösungsmittel zeigten in der Gelierungskinetik verschiedene Verläufe und Werte im Speichermodul (G'), blieben aber bei einer Lagerung über einen Tag hinaus, nicht stabil. Die beiden Ausnahmen bildeten das DMSO und DMF, wobei das DMF auch bei der Charakterisierung der Hydrogel-Platten deutlich niedrigere Speichermodule (G') zeigte als das DMSO. Aus diesem Grund ist für alle weiteren Versuche das DMSO als Lösungsmittel verwendet worden. Da die Imagel®-Hydrogele für Vorversuche zum Druck als Biotinte verwendet worden sind und Zellen eine Temperatur von 37 °C benötigen, wurden auch hier alle Messungen

am Oszillationsrheometer bei 37 °C durchgeführt. Ein zusätzlicher Versuch zeigte, dass die Senkung der Temperatur auf 22 °C zu deutlich höheren Werten in der Festigkeit des Hydrogels führen könnte. Dieser Ansatz spielte jedoch für die Entwicklung der Biotinte keine Rolle. Eine Erhöhung der Konzentration des Oligomers von 7 % auf 14 % konnte vernachlässigt werden, da in diesem Zusammenhang keine positive Beeinflussung der Festigkeit des Hydrogels auftrat. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Reihe an Hydrogelen gefunden wurde, die sich besonders für die Vorversuche am 3D-Drucker eigneten.

4.5.3 Chitosan-Hydrogele

Um eine spätere Einbettung der Zellen in die Chitosan-Lösung zu ermöglichen, wurde auch bei der Herstellung der Chitosan-Lösung versucht den physiologischen pH-Wert von etwa 7,4 zu erreichen. Wie Abbildung 92a zeigt, war dies mit der Ursprungsmethode [29] nicht möglich, da lediglich ein pH-Wert von 6,93 erreicht werden konnte. Die Weiterentwicklung bei der Herstellung des Chitosan-Hydrogels fokussierte sich aus diesem Grund auf die Erhöhung des resultierenden pH-Wertes. Dafür wurde zuerst die Anfangskonzentration der HCl von 0,1 M auf 0,05 M gesenkt und die Menge an β -GP von 200 mg auf 100 mg in 2 ml DMEM angepasst. Beide Anpassungen wurden in Abbildung 92 mit rotem Rahmen gekennzeichnet. Dabei wurde die Ursprungslösung von 0,1 M HCl auf 0,05 M HCl und die Menge an β -GP von 200 mg auf 100 mg in 2 ml DMEM angepasst. Die Grenzen sollten dabei zwischen pH 7,2 bis 7,6 gehalten werden [61].

a) Ursprüngliche Methode



b) Weiterentwickelte Methode

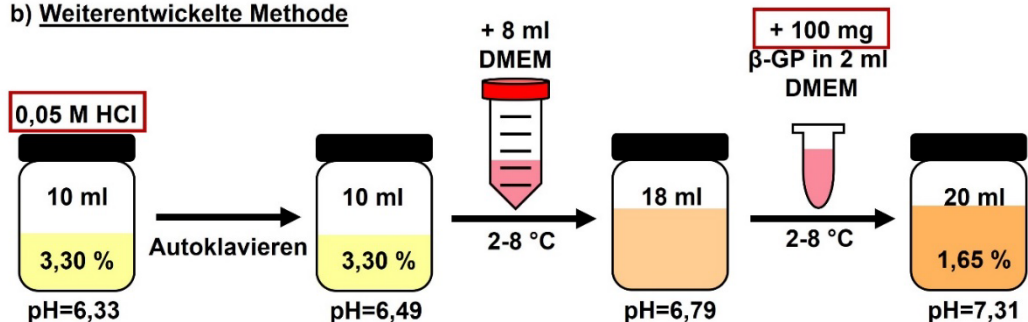


Abbildung 92: Herstellung der Chitosan-Lösung mit Anpassung des pH-Wertes. Das Chitosan wird zuerst in einer sauren Umgebung gelöst, bevor sie autoklaviert wird. Nach dem Autoklavieren werden zuerst unter Eiskühlung 8 ml DMEM zugegeben und anschließend nochmal 2 ml DMEM, welche β -GP als Base enthalten. Die beiden Abbildungen zeigen dabei einmal a) die ursprüngliche Methode [29] und b) die weiterentwickelte Methode, welche sich in der Konzentration der HCl-Lösung und der Menge an β -GP unterscheiden.

Wie in Abbildung 92 ersichtlich wird, konnte mit der Ursprungsmethode [29] nur ein pH-Wert von 6,93 erreicht werden. Mit den zwei beschriebenen Änderungen lag der pH-Wert am Ende bei der weiterentwickelten Methode bei 7,31 und nah an dem physiologischen pH-Wert. Aus diesem Grund wurde für alle Versuche eine 0,05 M HCl verwendet. Aufgrund der geringen Löslichkeit des Chitosans im neutralen Bereich musste bei der Herstellung besonders auf den ersten Schritt der Herstellung geachtet werden. Chitosan als schwache Base ist unlöslich in Wasser und organischen Lösungsmitteln. Unter pH 6,5 zeigt das Chitosan jedoch in verdünnter saurer Lösung eine ausreichende Löslichkeit [106]. Aus diesem Grund wurde die niedrig konzentrierte Salzsäure als Lösungsmittel ausgewählt. Wie Abbildung 93 zeigt, ist auch bei 0,05 M HCl noch eine leichte Trübung bei der Lösung nach dem Autoklavieren und vor allem nach der DMEM-Zugabe zu sehen. Bei einem erhöhtem pH-Wert, durch beispielsweise die DMEM-Zugabe und bei der Verwendung von niedrig konzentrierter HCl, kann es zur Präzipitation des Chitosans kommen [107]. Aus diesem Grund erfolgt die Zugabe der DMEM-Lösung unter Eiskühlung und sehr langsam. Das Hinzufügen der schwachen Base β -GP zu der wässrigen Chitosan-Lösung sorgt ebenfalls dafür, dass das Chitosan in Lösung bleibt [108]. Mit der weiterentwickelten Methode konnte das Chitosan in Lösung gebracht werden und die Präzipitation zum größten Teil verhindert werden.

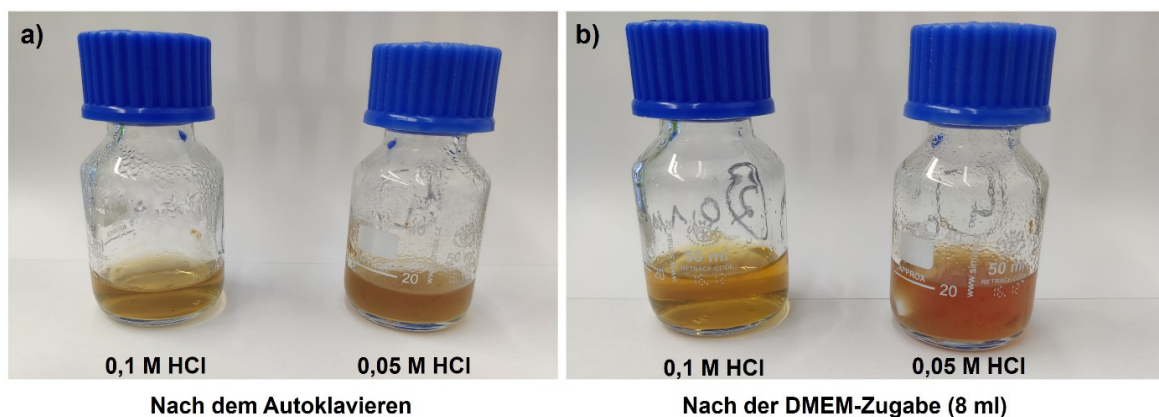


Abbildung 93: Aufnahmen der Chitosan-Lösungen in 0,1 M (links) oder 0,05 M (rechts) HCl a) nach dem Autoklavieren bzw. b) nach der DMEM-Zugabe von 8 ml.

4.5.3.1 Variation in der Art des Oligomers

Um den Einfluss der Art des Oligomers (40 %) auf die Festigkeit des Hydrogels zu beurteilen, wurde die Gelierungskinetik als Eigenschaft ausgewählt. Dafür wurde eine Reihe an Oligomeren von oSMoMA-2 bis oSMoMA-6 und eine Blindprobe, welche aus einer Mischung von DMSO und PG (7:3) und ohne Oligomer-Zusatz bestand, getestet. Abbildung 94 zeigt, dass sich bei oSMoMA-3 bis oSMoMA-5 eine Art Plateau im Speichermodul (G') einstellte, wo sich die Speichermodule (G') nicht mehr unterscheiden. Der Wert von oSMoMA-2 ist etwas geringer und bei oSMoMA-6 flacht der Wert des Speichermoduls (G') wieder deutlich ab. Alle Oligomere zeigen aber im Vergleich zu der Blindprobe ohne Oligomer-Zusatz eine eindeutige Erhöhung des Speichermoduls (G'). oSMoMA-7,5 und oSMoMA-10 konnten bei dieser Art von Hydrogel nicht mehr getestet werden (siehe Kapitel 4.4). Die vielversprechendsten Hydrogele für das Chitosan lieferten daher die Oligomere zwischen oSMoMA-3 und oSMoMA-5.

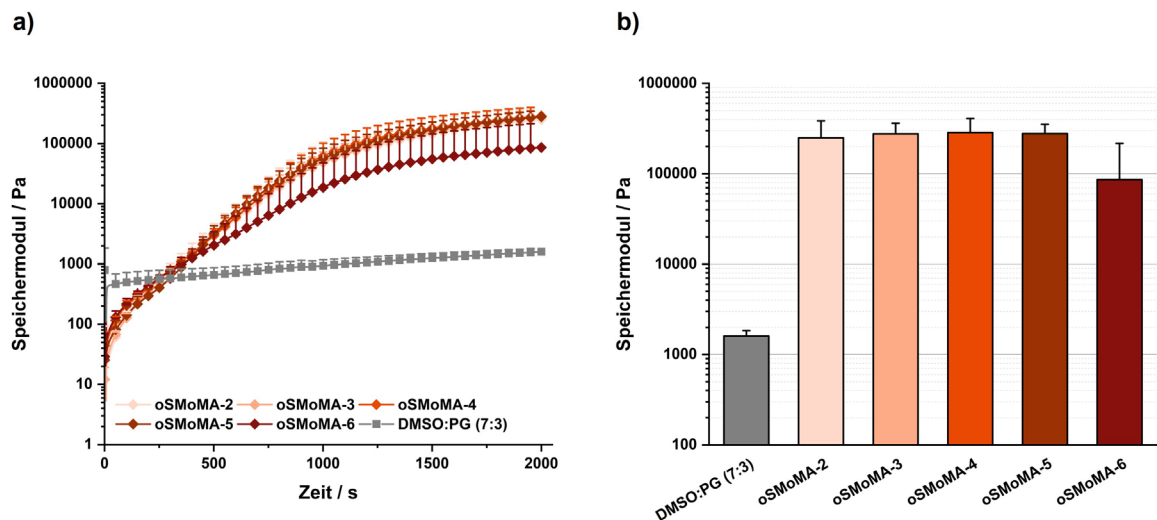


Abbildung 94: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik der Chitosan-Hydrogele anhand des Speichermoduls (G') mit a) verschiedenen Oligomeren und b) des Speichermoduls (G') bei 1000 Sekunden und verschiedenen Oligomeren. Verglichen wurden Oligomere von oSMoMA-2 bis oSMoMA-6, einschließlich einer Blindprobe ohne Oligomer-Zusatz ($n=3$, $MW \pm SD$).

4.5.3.2 Erhöhung der Autoklavierzeit

Am Beispiel von oSMoMA-4 (40 %) wurde das Hydrogel, wie in Abbildung 92 beschrieben, mit 0,05 M HCl, hergestellt. Dabei wurde die Autoklavierzeit von 15 Minuten (0,25 h Autoklavierzeit), wie es in der Normalität der Fall ist, mit einer Autoklavierzeit von 4 Stunden (4 h Autoklavierzeit) verglichen. Zusätzlich wurde hier eine Blindprobe ohne den Zusatz von einem Oligomer mitvergleichen. Wie Abbildung 95 zeigt, hat das Chitosan mit verlängerter Autoklavierzeit in Bezug auf den Speichermodul (G') und die Festigkeit des Hydrogels keinen großen Vorteil gegenüber der Blindprobe, bei der durch den fehlenden Oligomer-Zusatz keine Anhydrid-Gruppen vorhanden sind und somit keine Quervernetzung stattfindet. Nur das Hydrogel mit der Chitosan-Lösung, wo die Autoklavierzeit nicht verlängert wurde (0,25 h Autoklavierzeit), zeigte eine deutliche Erhöhung in der Festigkeit. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es bei 4 Stunden Autoklavierzeit und bei erhöhter Temperatur, zu einem hohen Anteil an hydrolysierten Chitosan-Molekülen kam, die zu einer unzureichenden Quervernetzungsreaktion führten. Als Polysaccharid können die vorhandenen Glykosid-Bindungen in saurer Umgebung gespalten werden [109]. Aus diesem Grund darf das Chitosan auch nicht zu lange oder mit zu hohen Konzentrationen an HCl behandelt werden.

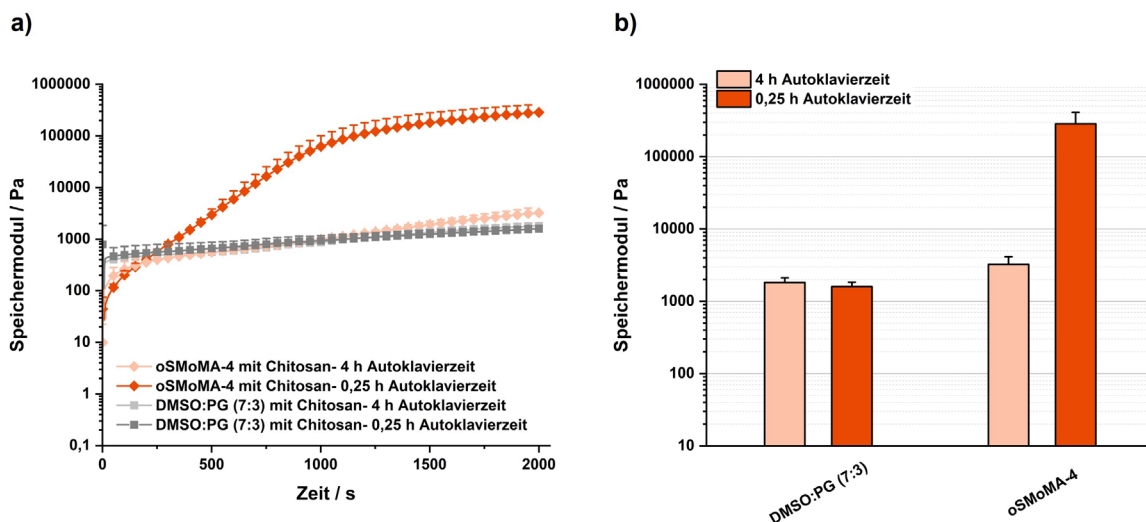


Abbildung 95: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik der Chitosan-Hydrogele anhand des Speichermoduls (G') mit a) 4 h Autoklavierzeit oder 0,25 h Autoklavierzeit und b) des Speichermoduls (G') bei 1000 Sekunden mit 4 h Autoklavierzeit oder 0,25 h Autoklavierzeit. Verglichen wurden eine Blindprobe (DMSO:PG (7:3) und ohne Oligomer-Zusatz) und oSMoMA-4 ($n=3$, $MW \pm SD$).

Die Trockengewichte und herauslösbaren Anteile (Abbildung 96) zeigen einen leichten Vorteil des Chitosans, welches für 15 Minuten autoklaviert worden ist, gegenüber dem Chitosan, welches für 4 Stunden autoklaviert worden ist.

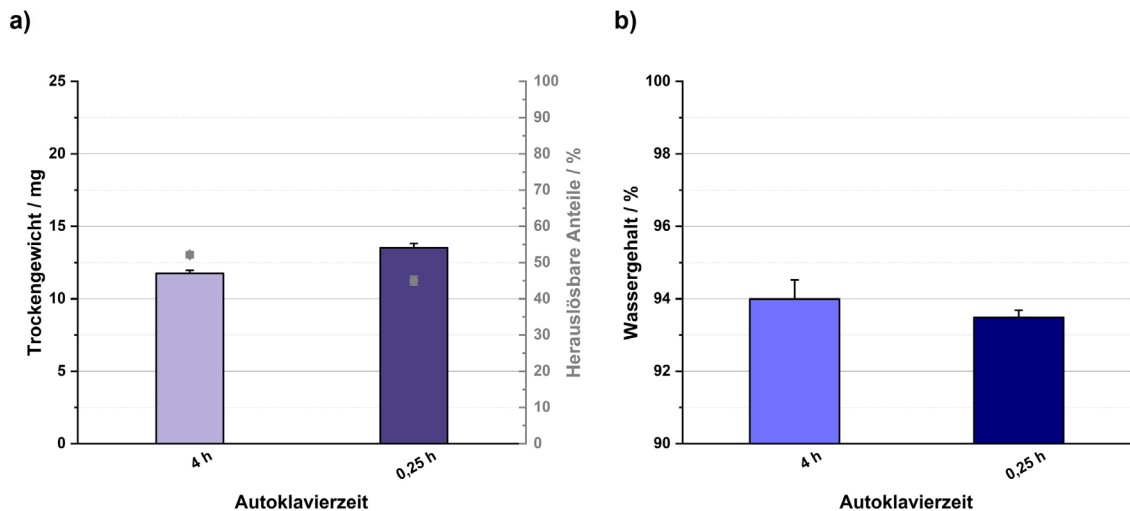


Abbildung 96: Physikochemische Charakterisierung der kleinen Hydrogel-Platten der Chitosan-Hydrogele über a) das Trockengewicht (mg) und die herauslösbaren Anteile (%) und b) den Wassergehalt (%) mit 4 h Autoklavierzeit oder 0,25 h Autoklavierzeit. Getestet wurde anhand von oSMoMA-4 ($n=3$, $MW \pm SD$).

Das zeigt, dass dennoch auch Hydrogele mit hydrolysiertem Chitosan (4 h Autoklavierzeit) hergestellt werden können, die nur in der Festigkeit direkt nach der Quervernetzungsreaktion einen geringeren Wert zeigen. Die Wassergehalte liegen mit etwa 94 % sehr nah beieinander und können bei der Auswertung vernachlässigt werden.

4.5.3.3 Variation in der Art des Lösungsmittels

In diesem und in dem nächsten Kapitel wurden für die Beurteilung der Ergebnisse nur die Gelierungskinetiken am Oszillationsrheometer betrachtet. Es wurde hier am Beispiel von oSMoMA-4 (40 %) und mit 0,05 M HCl verglichen, wie die Gelierungskinetik aussieht, wenn oSMoMA-4 in reinem DMSO und nicht in einer Mischung aus DMSO und PG (7:3) gelöst wird. PG wurde dem DMSO als Lösungsmittel zugesetzt, da es bereits oft in oralen, intravenösen und topischen Anwendungen in der pharmazeutischen Industrie genutzt wird und als sicher gilt [90]. Der Zusatz von PG sollte die Zytotoxizität von DMSO durch die reduzierte Menge senken. Wie Abbildung 97 zeigt, konnte festgestellt werden, dass es keinen Unterschied in der resultierenden Festigkeit des Hydrogels gibt.

Beide Varianten des Lösungsmittels für das Oligomer zeigen im Hydrogel dieselben Werte für die Festigkeit. Da im Hinblick auf den Einsatz als eventuelle Biotinte die Zytotoxizität des DMSOs geringgehalten werden sollte, wurde dennoch weiter mit der Mischung aus DMSO und PG weiterverfahren.

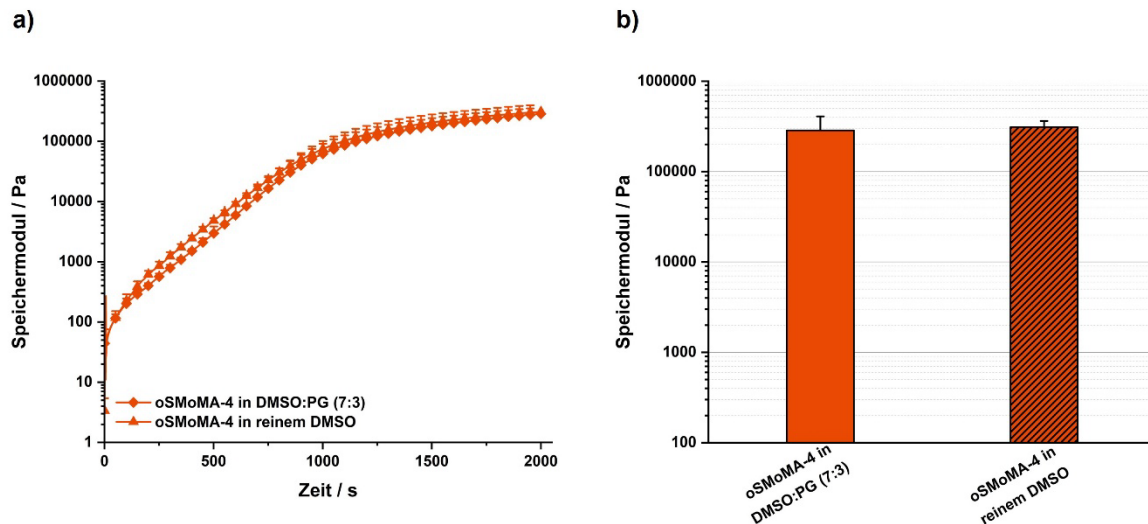


Abbildung 97: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik der Chitosan-Hydrogele anhand des Speichermoduls (G') mit a) DMSO:PG (7:3) oder reinem DMSO als Lösungsmittel und b) des Speichermoduls (G') bei 1000 Sekunden mit DMSO:PG (7:3) oder reinem DMSO als Lösungsmittel. Als vernetzende Hydrogel-Komponente wurde oSMoMA-4 verwendet ($n=3$, $MW \pm SD$).

4.5.3.4 Variation in der Konzentration der Oligomer-Lösung

Als Letztes wurde mittels der Oligomere oSMoMA-2, oSMoMA-3, oSMoMA-4, oSMoMA-5 und oSMoMA-6 verglichen, welchen Einfluss die Konzentration des Oligomers auf die Gelierungskinetik hat. Verwendet wurde hier die 0,05 M HCl und verglichen wurden eine 20%ige Oligomer-Lösung und eine 40%ige Oligomer-Lösung. Dabei zeigte sich (Abbildung 98), dass es bei jeder Art von Oligomer mit einer Konzentration von 20 % keinen positiven Effekt im Vergleich zur Blindprobe, welche aus einer Mischung von DMSO und PG (7:3) und ohne Oligomer-Zusatz bestand, gab. Erst bei einer Konzentration von 40 % sieht man ein erhöhten Speichermodul (G') und damit eine höhere Festigkeit des Hydrogels im Vergleich zu der Blindprobe. Wie in Kapitel 1.6.3 erwähnt, handelt es sich bei Chitosan um ein lineares Polysaccharid, das aus β -1,4-verknüpften 2-Amino-2-Desoxy-D-glucose (GlcNH_2) -Resten und zufällig angeordneten N-Acetylglucosamin (GlcNAc)-Gruppen besteht [38]. Die Gelierung erfolgt hier durch Quervernetzung (Amin-Anhydrid-Konjugation) der reaktive Amin-Gruppen im Rückgrat des Chitosans mit dem Quervernetzer oSMoMA-x. Im Fall der 20%igen Chitosan

stehen insgesamt weniger Chitosan-Moleküle zur Verfügung, die mit oSMoMA-x als Quervernetzer interagieren können. Die Folge ist eine unzureichende Anzahl an Vernetzungsstellen, in diesem Fall der Amin-Gruppen im Rückgrat des Chitosans, die die Ausbildung eines stabilen Gelnetzwerks verhindern.

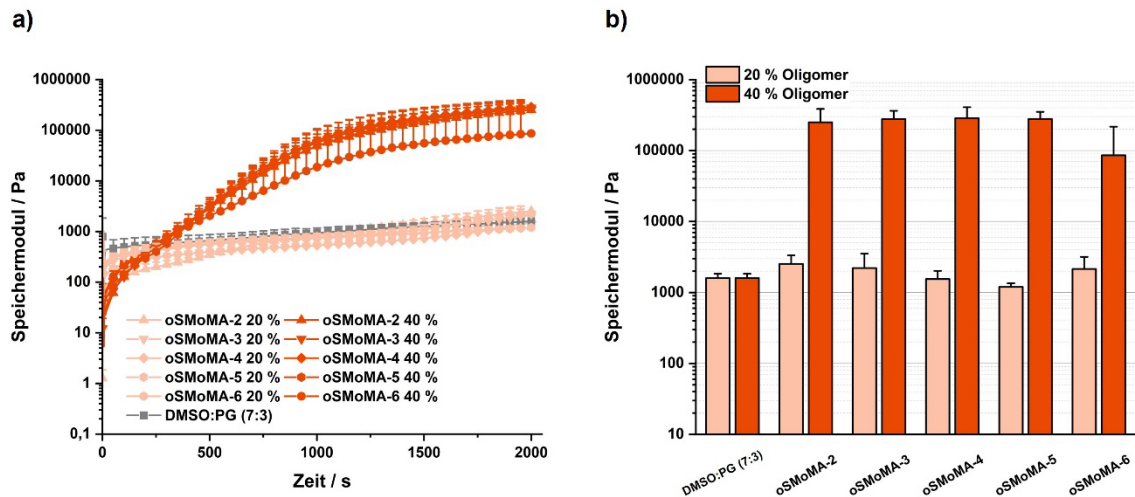


Abbildung 98: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik der Chitosan-Hydrogele anhand des Speichermoduls (G') mit a) 20%iger- oder 40%iger Oligomer-Lösung und b) des Speichermoduls (G') bei 1000 Sekunden mit 20%iger- oder 40%iger Oligomer-Lösung. Verglichen wurden Oligomere von oSMoMA-2 bis oSMoMA-6, einschließlich einer Blindprobe (DMSO:PG (7:3) und ohne Oligomer-Zusatz) ($n=3$, $MW \pm SD$).

4.5.3.5 Zusammenfassung

Bei den Chitosan-Hydrogelen wurde eine neue Methode zur Herstellung entwickelt, um eine eventuelle Einbettung von Zellen und die Entwicklung zu einer Biotinte zu ermöglichen. Aus diesem Grund musste der pH-Wert am Ende durch erfolgreiche Anpassungen in der Methode angehoben und die Präzipitation des Chitosans vermieden werden. Die anschließenden Variationen bei den Hydrogelen befassten sich mit der Variation in der Art des Oligomers, in der Überprüfung der Hydrolyse-Empfindlichkeit, in der Variation der Art des Lösungsmittels für das Oligomer und in der Konzentration des Oligomers. Die Variation der Art des Oligomers zeigte dabei hinsichtlich der Festigkeit des Hydrogels ein Plateau des Wertes für den Speichermodul (G') zwischen oSMoMA-3 bis oSMoMA-5. In diesem Bereich können alle Oligomere für die Hydrogel-Herstellung verwendet werden. Nichtsdestotrotz zeigen alle Hydrogele, die mit Chitosan als natürliches Biopolymer hergestellt worden sind, hohe Werte für die herauslösbaren Anteile, was für weniger stabile Hydrogele über eine längere Zeit spricht. Die Festigkeit

hingegen ist im Vergleich zu den Gelatine- oder Imager[®]-Hydrogelen um mehrere Zehnerpotenzen höher. Da es sich bei HCl um eine Säure handelt, wurde die Hydrolyse-Empfindlichkeit des Chitosan durch eine erhöhte Autoklavierzeit von 4 Stunden getestet. Dabei stellte sich heraus, dass das Chitosan nach den 4 Stunden nicht mehr in der Lage ist stabile Hydrogele zu bilden, sodass bei der Wahl der Dauer der Autoklavierzeit und der Konzentration auf die gegebene Hydrolyse-Empfindlichkeit geachtet werden musste. Der Austausch von DMSO und PG (7:3) zusammen gegen reines DMSO zeigt keine Verbesserung in der Festigkeit des Hydrogels, sodass aufgrund der Zytotoxizität des DMSOs die ursprüngliche Kombination beibehalten worden ist. Die Erniedrigung der Konzentration des Oligomers von 40 % auf 20 % zeigte im Vergleich zum Blindwert keinen Unterschied mehr, sodass die Konzentration von 40 % für alle weiteren Versuche verwendet worden ist. Aufgrund der geringen Stabilität der resultierenden Hydrogel-Platten und den zu hohen Werten in der Festigkeit für den 3D-Druck, wurde sich bei der Wahl der Biotinte auf die Gelatine-Hydrogele fokussiert.

4.6 Entwicklung der Biotinten

Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzungen der verschiedenen Hydrogele, konnten nur die Hydrogele mit Gelatine als bioabbaubare Komponente für die Entwicklung als Biotinte in Betracht gezogen werden. Die Imagel®-Hydrogele enthielten für die Einbettung der Zellen in das Hydrogel einen zu hohen Anteil an zelltoxischen Komponenten, wie z.B. NMPO [21]. Da die Biotinte für den Extrusionsdruck geeignete rheologische Eigenschaften aufweisen muss, die eine Dosierung und Ablage des Materials als freistehendes Filament mit dem Druckkopf ermöglichen [87], waren die Chitosan-Hydrogele aufgrund ihrer zu hohen Festigkeit zu diesem Zeitpunkt noch nicht für den Einsatz als Biotinte geeignet. Aus diesem Grund zeigt das folgende Kapitel den zeitlichen Verlauf der Weiterentwicklung des Gelatine-Hydrogels bis zu den oben verwendeten Verhältnissen und Zusammensetzungen.

4.6.1 Anpassung des Lösungsmittels für Gelatine und Oligomer

Als die ursprüngliche Zusammensetzung (Tabelle 2) der Gelatine-Hydrogele auf oSMoMA-x übertragen worden ist, wurde festgestellt, dass die resultierenden Hydrogele keine ausreichende Festigkeit für Zellexperimente zeigten und die Konzentration an toxischen Lösungsmitteln insgesamt sehr hoch war. Die ursprüngliche Zusammensetzung bestand dabei aus einer 5,4%igen Lösung von Gelatine in Wasser, einer 8,3%igen Lösung von TEOA in Wasser und einer 60%igen Oligomer-Lösung in DMSO:NMP (3:1). Das Verhältnis der Komponenten zueinander betrug 50:30:10 [30]. Mit dem Ziel eine Biotinte zu entwickeln, wurde angestrebt, die Zellen besser in das Hydrogel einbauen und ihnen die Proliferation und Differenzierung erleichtern zu können. Durch vorherige Experimente konnte oSMoMA-3,5 als Optimum für die Hydrogel-Herstellung mit Gelatine festgelegt werden. Der erste Ansatz beschäftigte sich mit der Möglichkeit, wie man die Zellen in das Hydrogel einbauen und die Zytotoxizität des Lösungsmittels und des Oligomers verringern könnte (Tabelle 8). Jede Zelllinie benötigt ein auf die Bedürfnisse angepasstes Zellkulturmedium, das die wichtigen Nährstoffe liefert. Demineralisiertes Wasser als Lösungsmittel kann dafür nicht genutzt werden.

Tabelle 8: Erster Ansatz zur Weiterentwicklung des ursprünglichen Gelatine-Hydrogels zur Biotinte. Die grau unterlegten Felder zeigen den Fokus der aktuellen Veränderungen an.

Komponente	Lösungsmittel	Stammlösung		Im Hydrogel [%]
		%	µl	
Gelatine	Wasser	5,4	50	3,0
TEOA	Wasser	8,3	30	2,8
Oligomer	DMSO:NMP (3:1)	60	10	6,7

Bei DMEM handelt es sich um ein häufig verwendetes Universalmedium, das die Modifizierung des Basal- bzw. Minimalmediums nach Eagle mit höheren Konzentrationen an Nährstoffen darstellt [110]. Aus diesem Grund wurde zuerst versucht die Gelatine (Typ A, B300) statt in demineralisiertem Wasser in reinem DMEM (5,4 %) zu lösen. Die Konzentration von Gelatine mit 5,4 % im Hydrogel sollte dabei unverändert bleiben [68]. Zeitgleich wurde die Mischung aus DMSO:NMP (3:1) durch reines DMSO und DMSO:PG (7:3) ausgetauscht. Zur Beurteilung der Zytotoxizität einer Substanz kann der LD50-Wert herangezogen werden. Er beschreibt die Dosis bei 50 % Sterblichkeit [111]. Wie Tabelle 9 zeigt, hat das NMP als Lösungsmittel in beiden Tieren und bei oraler und intravenöser Gabe die niedrigsten LD₅₀-Werte, gefolgt von DMSO und PG. Das bedeutet, dass eine niedrigere Dosis erforderlich ist, um eine Sterblichkeit von 50 % zu erreichen. Da die biofabrizierten Hydrogele jedoch überwiegend für andere Zwecke als die orale oder intravenöse Verabreichung eingesetzt werden, ist ein direkter Vergleich mit den hier gewählten Applikationsarten nicht möglich. Beschrieben wurden bisher beispielsweise die intraartikuläre Injektion bei Gelenkknorpelschäden, verursacht durch Trauma oder Arthrose [112], oder die subkutane Injektion zur lokalen Gewebemodellierung und Vaskularisierungsförderung zur Wundheilung [113]. Zur Abschätzung der Zytotoxizität von Lösungsmitteln nach Applikation können die hier vorgestellten Daten jedoch verwendet werden. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Versuchen getestet das NMP gegen die beiden anderen Lösungsmittel zu ersetzen [114].

Tabelle 9: LD₅₀-Werte (mg/kg) für verschiedene Lösungsmittel bei oraler und intravenöser Gabe [114].

	DMSO	NMP	PG
oral			
Maus	7920	5130	22000
Ratte	14500	3914	20000
Intravenös			
Maus	3100	55	6630
Ratte	5360	81	6423

Um die Ergebnisse der verschiedenen Lösungsmittel zu vergleichen, wurde die Festigkeit anhand des Speichermoduls (G') mittels eines zeitabhängigen Oszillationstests beurteilt (Abbildung 99).

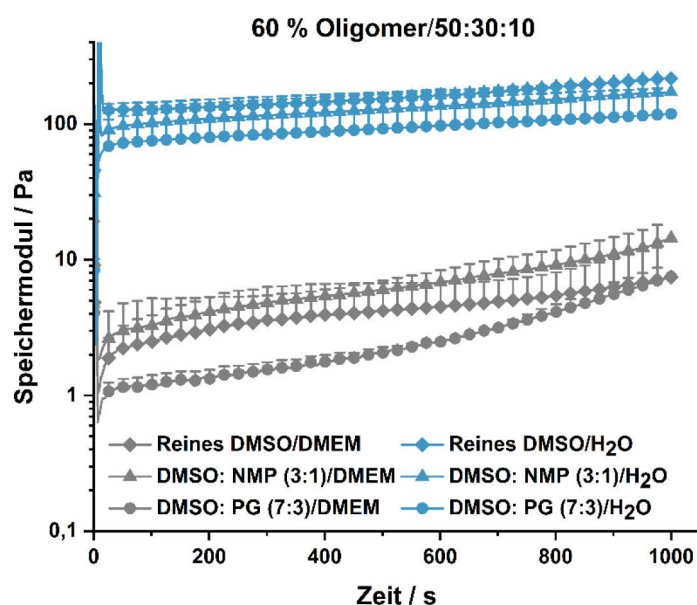


Abbildung 99: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik der Gelatine-Hydrogele anhand des Speichermoduls (G'). Verglichen wurden verschiedene Lösungsmittel für die Gelatine (DMEM und H₂O) und verschiedene Lösungsmittel für das oSMoMA-3,5 (reines DMSO, DMSO:NMP (3:1) und DMSO:PG (7:3), ($n=3$, $MW \pm SD$)).

Dabei fiel auf, dass die Hydrogele, die mit reinem demineralisiertem Wasser als Lösungsmittel für die Gelatine hergestellt wurden, eine deutlich höhere Festigkeit aufwiesen als die Hydrogele, die mit reinem DMEM hergestellt wurden. Diese Feststellung war unabhängig von dem Lösungsmittel für das Oligomer. Bei den unterschiedlichen Lösungsmitteln für das Oligomer zeigte sich, dass die Mischung aus DMSO und Propylenglykol die geringste Festigkeit aufwies und es zwischen reinem DMSO und der Mischung DMSO:NMP (3:1) keinen großen Unterschied gab. Ein möglicher Grund für die niedrige Festigkeit der Hydrogele mit Anteil an Propylenglykol könnte sein, dass die Nukleophilie des Propylenglykols ausreicht, um selbst in einer Konkurrenzreaktion mit den Anhydriden zu reagieren. Ein anderer Grund könnte die stärkere Solvatisierung der Amine durch das Propylenglykol sein. Das Lösungsmittel kann die Reaktivität von Aminen abhängig von den gegebenen Bedingungen erhöhen oder erniedrigen. Für den Fall der Epoxid-Amin-Reaktion beschrieben auch Mora *et al.* bereits, dass das Lösungsmittel einen Einfluss auf den Reaktanten haben kann, indem es dessen Eigenschaften und Reaktivität verändert. Je nach Lösungsmittel variiert das Ausmaß der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Lösungsmittel und Reaktant, was die Reaktion beeinflussen kann [115]. In diesem Fall wäre möglich, dass die Amine über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Propylenglykol interagieren, was durch weniger frei verfügbare Amine zu einer niedrigeren Reaktivität führt. Im Vergleich zu den anderen Lösungsmitteln ist Propylenglykol nicht nur Wasserstoffbrückenbindungen-Akzeptor, sondern auch -donor. Aufgrund der oben beschriebenen erhöhten Zytotoxizität von NMP, wurde für weitere Versuche reines DMSO als Lösungsmittel für oSMoMA-3,5 verwendet. Da die Festigkeit der Hydrogele mit reinem DMEM unzufriedenstellend waren, die Zellen aber mittels Nährmedium ins Hydrogel gebracht werden müssen, wurde eine Methode entwickelt die Gelatine in demineralisiertem Wasser zu lösen aber anschließend mit DMEM zu verdünnen und so die Zellen in das Hydrogel einzubringen. Dazu wurde die Gelatine in 10,8 % oder 8,1 % in demineralisiertem Wasser gelöst und anschließend mit DMEM auf 5,4 % verdünnt. Für die 10,8 % wurde eine 1:1 Verdünnung und für 8,1 % eine 2:1 Verdünnung getestet (siehe vorher und nachher Darstellung in Abbildung 100).

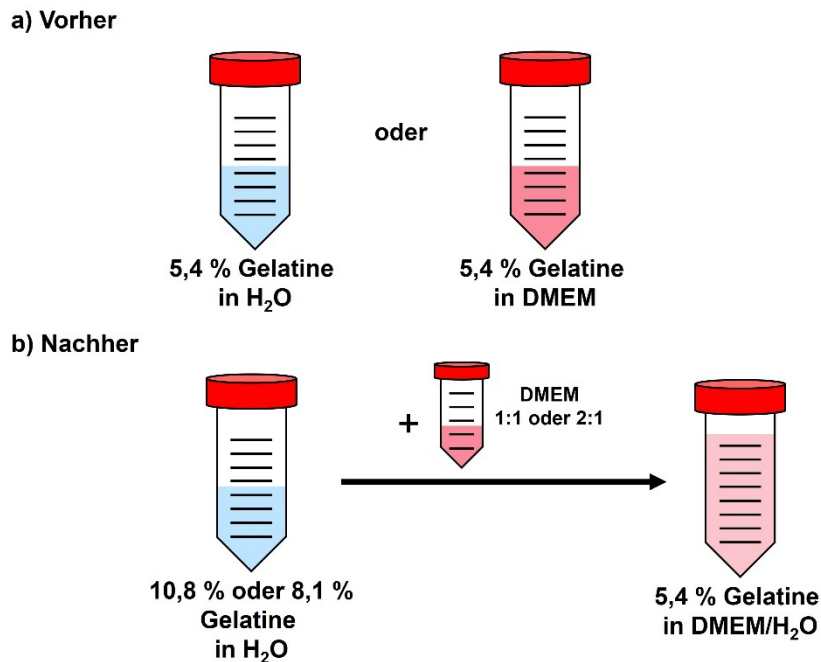


Abbildung 100: Anpassung der ursprünglichen Gelatine-Lösung, um die spätere Einbettung von Zellen zu ermöglichen. Dabei wurde das zuvor benutzte a) reine demineralisierte Wasser oder reine DMEM gegen b) eine Mischung aus demineralisiertem Wasser und DMEM getauscht.

Zeitgleich wurde dabei die Herstellungsmethode für die Gelatine-Lösung angepasst, wie in Abbildung 101 gezeigt wird. Zuvor wurde die Gelatine-Lösung für 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert, bevor sie sterilfiltriert wurde, in der neuen Methode ist eine direkte Sterilfiltration nach einer Stunde möglich. Durch die erhöhte Konzentration an Gelatine (10,8 % und 8,1 %) und einer dadurch erhöhten Viskosität, musste die Lagerungstemperatur vor der Filtration von 40 °C auf 60 °C erhöht werden. Die Hydrogel-Struktur der Gelatine in wässriger Lösung verhält sich wie ein Feststoff, wenn die Temperatur unter die kritische Lösungstemperatur von 25-35 °C sinkt. Eine Temperaturerhöhung hingegen führt zu einem flüssigen Zustand, sodass die Viskosität der Gelatine-Lösung neben der Konzentrations-Abhängigkeit stark temperaturabhängig ist [116]. Anschließend erfolgte in beiden Methoden eine Lagerung über 24 Stunden vor der Verwendung. Dabei wurde die Lagerungstemperatur auf 37 °C angepasst, um anschließend eine direkte Verwendung für die Zellversuche zu ermöglichen.

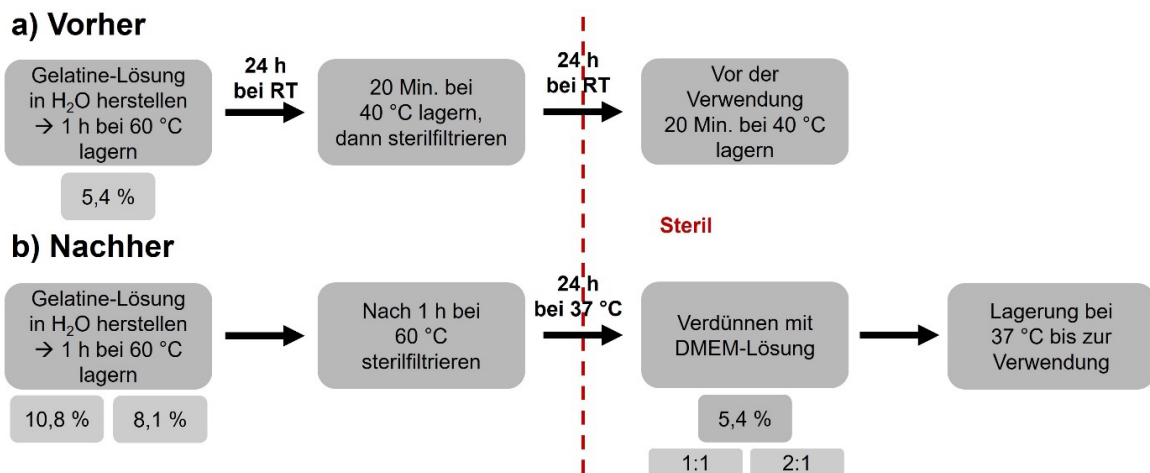


Abbildung 101: Herstellung der Gelatine-Lösung nach alter Methode (a) und nach neuer Methode (b). Die Verdünnung mit der DMEM-Lösung ermöglicht die Einbettung von lebenden Zellen.

Die drei Varianten der Gelatine-Lösungen (reines demineralisiertes Wasser, reine DMEM und DMEM/H₂O) zeigten auch unterschiedliche Farben der Lösungen. Die Gelatine-Lösung in reinem demineralisiertem Wasser zeigte keine Farbe (Abbildung 102a). Die beiden anderen Gelatine-Lösungen, die DMEM enthielten, zeigten pH-abhängig eine Farbänderung, da Phenolrot als Farbindikator in DMEM enthalten war. Wie oben beschrieben zeigt Phenolrot im neutralen und basischen Bereich eine kirschrote Farbe und im sauren Bereich (< 7,2) eine gelbliche Farbe. Die Farbe der Gelatine-Lösung in reinem DMEM zeigt die kirschrote Farbe (Abbildung 102b), während der pH-Wert bei der Kombination aus demineralisiertem Wasser und DMEM eine eher gelblichere Farbe und somit einen niedrigeren pH-Wert zeigt (Abbildung 102c). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Mischung aus demineralisiertem Wasser und DMEM den pH-Wert der reinen DMEM gesenkt hat.

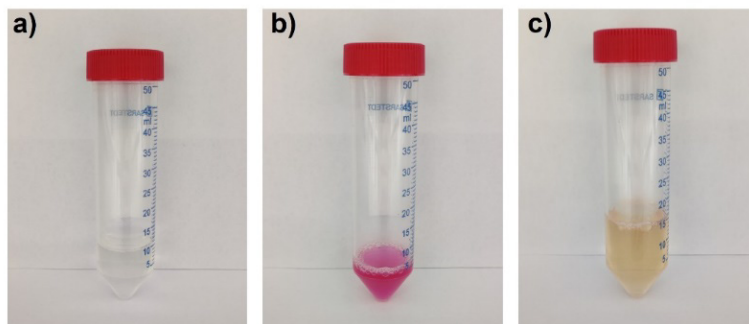


Abbildung 102: Aufnahmen der Gelatine-Lösungen mit a) in demineralisiertem Wasser, b) in reiner DMEM und c) in DMEM/H₂O.

Um zu überprüfen, ob der pH-Wert der Gelatine-Lösung bei der Verwendung von DMEM/H₂O auf Grund der gelblichen Farbe zu sauer sein könnte, um diese als Zellgrundlage zu verwenden, wurden die pH-Werte aller Lösungen gemessen (Tabelle 10). Das reine DMEM als Lösungsmittel wurde dabei nicht betrachtet, da die Festigkeit des Hydrogels für weitere Versuche nicht ausreichend war.

Tabelle 10: pH-Werte der Gelatine-Lösungen vor und nach der Verdünnung mit unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen (10,8 % oder 8,1 %).

	pH-Wert in H ₂ O Vor der Verdünnung	pH-Wert in DMEM/H ₂ O Nach der Verdünnung
10,8 %	5,26	6,59
8,1 %	5,50	6,34

Die Ergebnisse der pH-Wertmessung zeigten pH-Werte von 6,59 (10,8 %) und 6,34 (8,1 %) nach der Verdünnung mit DMEM. Da auch die Festigkeit des Hydrogels keinen großen Unterschied zwischen der 10,8%igen und der 8,1%igen Gelatine-Lösung zeigte (Abbildung 103) und die Sterilfiltration für die 8,1%ige Lösung einfacher durchzuführen war, wurde sich für die 8,1%ige Lösung entschieden.

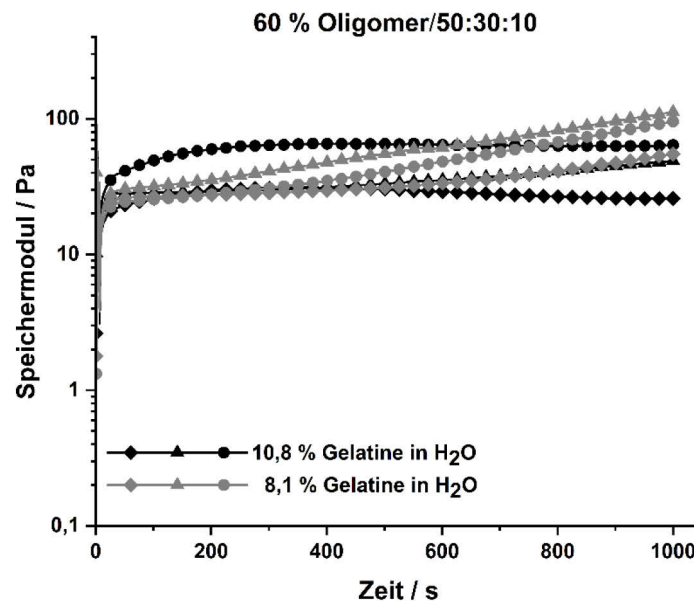


Abbildung 103: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik anhand des Speichermoduls (G') in Form von Einzelkurven. Verglichen wurden die Gelatine-Hydrogele mit 10,8%iger- oder 8,1%iger Ausgangslösung der Gelatine. Als Oligomer wurde oSMoMA-3,5 verwendet ($n=3$).

Der optimale physiologische pH-Wert für die Umgebung der Zellen sollte im Bereich von 7,2 bis 7,6 liegen [61]. Um den pH-Wert zu erhöhen, wurden tropfenweise 1, 2 und 3 Tropfen 1 M NaOH vor der Verdünnung zu der Gelatine-Lösung gegeben (Abbildung 104) und anschließend nochmal der pH-Wert der Lösung gemessen.

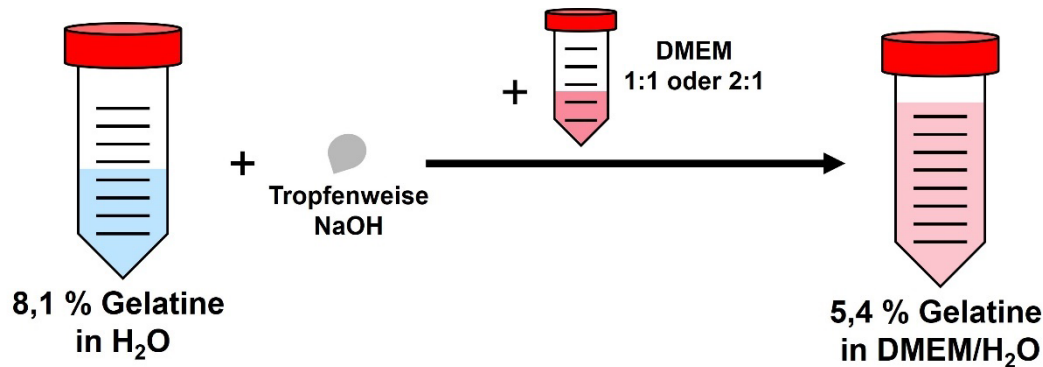


Abbildung 104: Tropfenweise Zugabe von 1 M NaOH zur Gelatine-Lösung, um den pH-Wert der resultierenden Lösung zu erhöhen. Dabei wurden 1, 2 und 3 Tropfen getestet.

An den Daten der pH-Werte nach der Verdünnung (Abbildung 105) wird ersichtlich, dass die DMEM etwa in dem gewünschten Bereich von 7,2 bis 7,6 puffert und es keine großen Unterschiede zwischen den verschiedenen Mengen an NaOH gibt (Abbildung 105a). Der physiologische Puffer ist das CO_2/HCO_3 -System. Aus diesem Grund wird den Zellkulturmedien NaHCO_3 zugesetzt und zeitgleich mit dem Inkubator eine Atmosphäre von 5 % CO_2 erzeugt [61]. Aus den Speichermodulen (G') wird ersichtlich (Abbildung 105b), dass die Festigkeit der Hydrogele mit sinkendem pH-Wert abnimmt. Das höchste Speichermodul (G') bei den Mischungen von DMEM/ H_2O zeigt die Mischung ohne die Zugabe von einem Tropfen NaOH. Von reinem Wasser über die Mischung DMEM/ H_2O mit unterschiedlichen Mengen an NaOH bis hin zu reinem DMEM erhöht sich der Anteil an Elektrolyten in dem Hydrogel. Dieser Trend spiegelt sich auch genau in der Höhe der Speichermodule wider. Wie V. Ball bereits sagte, sind die Auswirkungen von Elektrolyten auf Hydrogele im Gegensatz zu anderen physikalisch-chemischen Systemen bisher nur am Rande untersucht worden. Dennoch konnten zuvor ionische Effekte in Hydrogelen sowohl auf die Wassermoleküle als auch auf die Quervernetzer beobachtet werden. Insbesondere die Polysaccharid-Hydrogele wiesen dabei ionenspezifische Eigenschaften auf, da in vielen Untersuchungen

eine spezifische Adsorption von Kationen und Anionen an das Biopolymer nachgewiesen werden konnte [117]. In diesem Fall wird vermutet, dass sich die erhöhte Anzahl an Elektrolyten in diesem System negativ auf die Hydrogel-Bildung auswirkt. Aus diesem Grund wurde entschieden die Mischung aus demineralisiertem Wasser und DMEM ohne weitere Zugabe von NaOH und mit einem Tropfen NaOH weiter zu vergleichen.

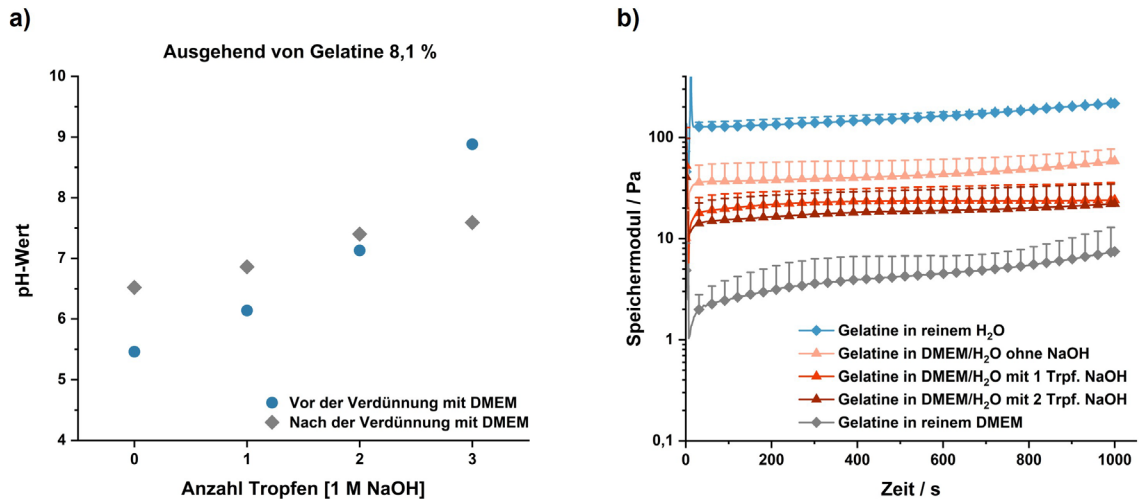


Abbildung 105: a) pH-Werte der Gelatine-Lösungen mit unterschiedlichen Anzahlen an Tropfen NaOH (vor und nach der Verdünnung mit DMEM, $n=1$) und b) rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik des Gelatine-Hydrogels anhand des Speichermoduls (G') Lösungen mit unterschiedlicher Anzahl an Tropfen NaOH und reinem demineralisiertem Wasser bzw. reiner DMEM ($n=3$, $MW \pm SD$).

4.6.2 Anpassung des Verhältnisses und der Oligomer-Konzentration

Alle Experimente von 4.6.1 wurden mit einem Verhältnis der Komponenten von 50:30:10, einer Konzentration vom TEOA von 8 % und einer Oligomer-Konzentration von 60 % getestet. Weitere Vorhaben die Hydrogel-Zusammensetzung durch eine Senkung der Lösungsmittel-Konzentration weniger zelltoxisch zu machen, beschäftigten sich mit der Anpassung des Verhältnisses der Komponenten zueinander. Die DMSO-Konzentration im Verhältnis 50:30:10 betrug 11,11 %, in der neuen Zusammensetzung (55:30:5) betrug sie durch die Reduzierung an Oligomer-Lösung nur noch 5,56 %. Beispielsweise beträgt die Konzentration, die zur Kryokonservierung von Zellen genutzt wird, nur 1,5 mol/l [118]. Zusätzlich wurde getestet, ob die Ausgangskonzentration an Oligomer in der Stammlösung, ohne die Festigkeit des resultierenden Hydrogels zu beeinflussen, gesenkt werden könnte (Tabelle 11).

Tabelle 11: Zweiter Ansatz zur Weiterentwicklung des ursprünglichen Gelatine-Hydrogels zur Biotinte. Die grau unterlegten Felder zeigen dabei den Fokus der aktuellen Veränderungen an.

Komponente	Lösungsmittel	Stammlösung		Im Hydrogel [%]
		%	µl	
Gelatine	DMEM/Wasser	5,4	50	3,0
TEOA	Wasser	8,3	30	2,8
Oligomer	DMSO	60	10	6,7

Dazu wurden in einem Einzelversuch am Oszillationsrheometer, ohne Zugabe von NaOH, Oligomer-Konzentrationen von 7,5 %, 15 %, 30 % und 60 % mit beiden Verhältnissen (50:30:10 und 55:30:5) getestet und die Festigkeit der Hydrogele anhand des Kurvenverlaufs des Speichermoduls (G') bei einer Zeit von 1000 Sekunden beurteilt (Abbildung 106).

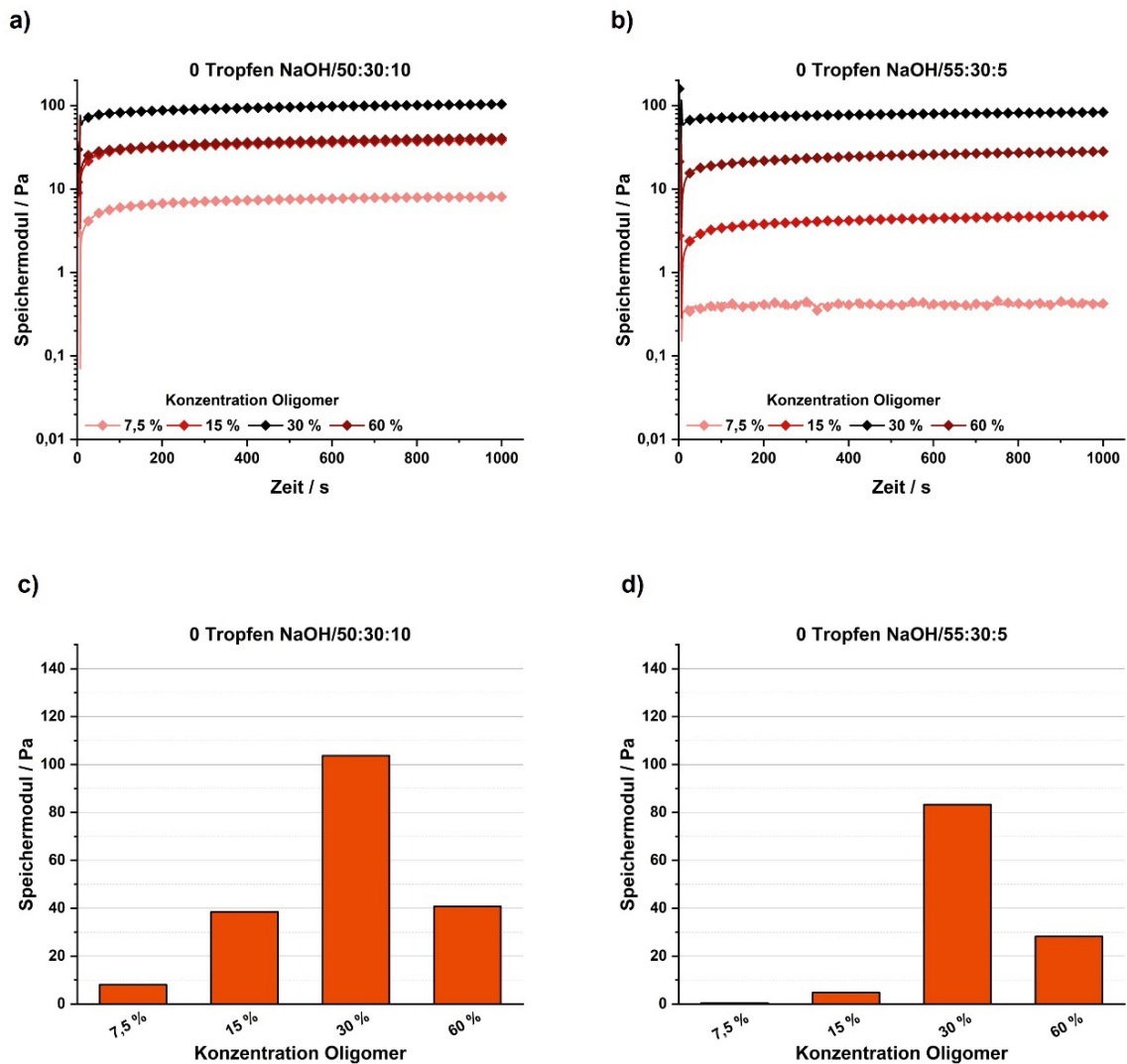


Abbildung 106: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik der Gelatine-Hydrogele anhand des Speichermoduls (G') mit a) 0 Tropfen NaOH und dem Verhältnis 50:30:10 und b) 0 Tropfen NaOH und dem Verhältnis 55:30:5 und des Speichermoduls bei 1000 Sekunden (G') mit c) 0 Tropfen NaOH und dem Verhältnis 50:30:10 und d) 0 Tropfen NaOH und dem Verhältnis 55:30:5. Verglichen wurden Oligomer-Konzentrationen von 7,5 - 60 % ($n=1$).

Anhand der Graphen wurde festgestellt, dass die Oligomer-Konzentration von 30 % bei beiden Verhältnissen zu den höchsten Speichermodulen und damit den Hydrogelen mit der höchsten Festigkeit führt. Nach den 30 %, folgen die 60 %, die 15 % und als letztes die 7,5 %. Das heißt eine Erhöhung der Oligomer-Konzentration über 30 % hinaus, führt nicht zu einem verbesserten Ergebnis bei der Quervernetzungsreaktion, da es wahrscheinlich zu einer Absättigung der Amin-Gruppen der natürlichen Biopolymere kommt und damit eine Quervernetzung ausbleibt. Die Verwendung von 7,5 % und 15 % Oligomer-Lösung führt zudem bei dem Verhältnis von 55:30:5 zu einer unzureichenden Gelierung.

Bei dem Verhältnis 50:30:10 führen beide Konzentrationen zu einer besseren Gelierung mit höherem Speichermodul aber bleiben dennoch weit unter dem der 30%igen und 60%igen Oligomer-Lösung. Da das Verhältnis bei der Konzentration von 30 % und 60 % Oligomer-Lösung keinen großen Unterschied macht, wurden bei dem Verhältnis von 55:30:5 nochmal die Konzentration von 30 % und 60 % Oligomer bei keiner Zugabe von NaOH und bei einem Tropfen NaOH (1 M) betrachtet (Abbildung 107). Auch hier zeigte sich anhand des höheren Speichermoduls, dass die 30%ige Oligomer-Lösung zu Hydrogelen mit einer höheren Festigkeit führte. Zudem gab es keinen ersichtlichen Unterschied zwischen der Zugabe von NaOH (1 M) oder keiner Zugabe an NaOH (1 M).

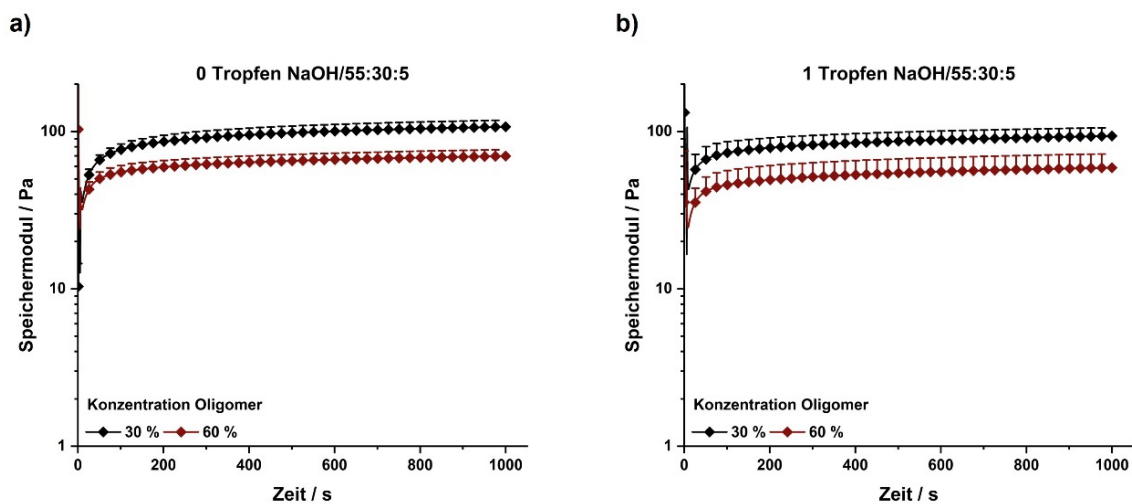


Abbildung 107: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik der Gelatine-Hydrogele anhand des Speichermoduls (G') mit a) 0 Tropfen NaOH und dem Verhältnis 55:30:5 und b) 1 Tropfen NaOH (1 M) und dem Verhältnis 55:30:5. Verglichen wurden eine 30%ige und eine 60%ige Oligomer-Lösung ($n=3$, $MW \pm SD$).

Zusätzlich wurden in Abbildung 108 auch das Trockengewicht, die herauslösbaren Anteile und der Wassergehalt dieser Hydrogele bestimmt und verglichen. Dabei zeigte sich, dass jeweils das Trockengewicht der Hydrogele mit der 30%igen Oligomer-Lösung leicht über dem der 60%igen Lösungen liegt und der Anteil der herauslösbaren Teile auch kleiner ist, was für eine bessere Stabilität der Hydrogele bei den 30%igen Lösungen spricht. Der Wassergehalt lag bei allen Gelen um die 95 % und zeigte keine großen Unterschiede.

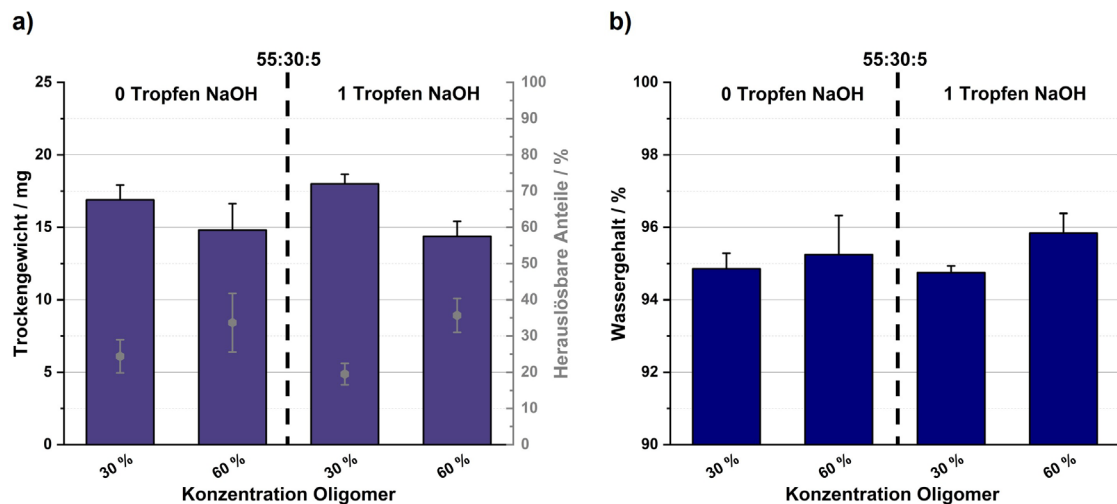


Abbildung 108: Physikochemische Charakterisierung der kleinen Hydrogel-Platten der Gelatine-Hydrogele über a) das Trockengewicht (mg) und die herauslösbaren Anteile (%) und b) den Wassergehalt (%) mit 0 oder 1 Tropfen NaOH (1 M). Verglichen wurden eine 30%ige und eine 60%ige Oligomer-Lösung ($n=3$, $MW \pm SD$).

4.6.3 Anpassung der Konzentration an Triethanolamin (TEOA)

Ausgehend von der 30%igen Oligomer-Lösung wurden jeweils bei 0 Tropfen NaOH und bei 1 Tropfen NaOH (1 M) und bei den Verhältnissen von 50:30:10 und 55:30:5 verschiedene Basen-Konzentrationen an TEOA getestet und verglichen. Orientiert wurde sich an der ursprünglichen Zusammensetzung [30] mit einer Konzentration von 8,3 %. Für die einfache Handbarkeit wurde hier als höchste Konzentration 8 % getestet. Ein Beispiel für die Nutzung von TEOA im Zusammenhang mit der Herstellung von Hydrogelen in der Literatur ist die Kombination mit Erythrosin als Initiator für die radikalische Polymerisation nach UV-Lichteinwirkung [119]. Hier dient TEOA aber lediglich als Protonenfänger für die Amin-Anhydrid-Konjugation. Getestet wurden die Konzentrationen von 3 %, 4 %, 6 % und 8 % TEOA. Die Kurven der Gelierungskinetik und die Einzelwerte bei 1000 Sekunden zeigen (Abbildung 109, 110), dass eine Basen-Konzentration

von 6 % zu den höchsten Speichermodulen (G') und somit zu den Hydrogelen mit der höchsten Festigkeit führte. Eine Ausnahme gab es bei dem Verhältnis 50:30:10 mit 1 Tropfen NaOH (1 M), wo 4 % zu den besten Ergebnissen führte. Das bedeutet, dass eine gewisse Basen-Konzentration notwendig ist, um die übrigen Protonen abzufangen und zu einer guten Quervernetzungsreaktion zu führen, ab einem bestimmten Punkt, in diesem Fall 6 %, aber keine Verbesserung mehr in der Festigkeit des Hydrogels eintritt. Vergleicht man die beiden Verhältnisse miteinander, stellt man fest, dass das Verhältnis mit 55:30:5 verglichen zu 50:30:10 zu insgesamt höheren Speichermodulen (G') führt.

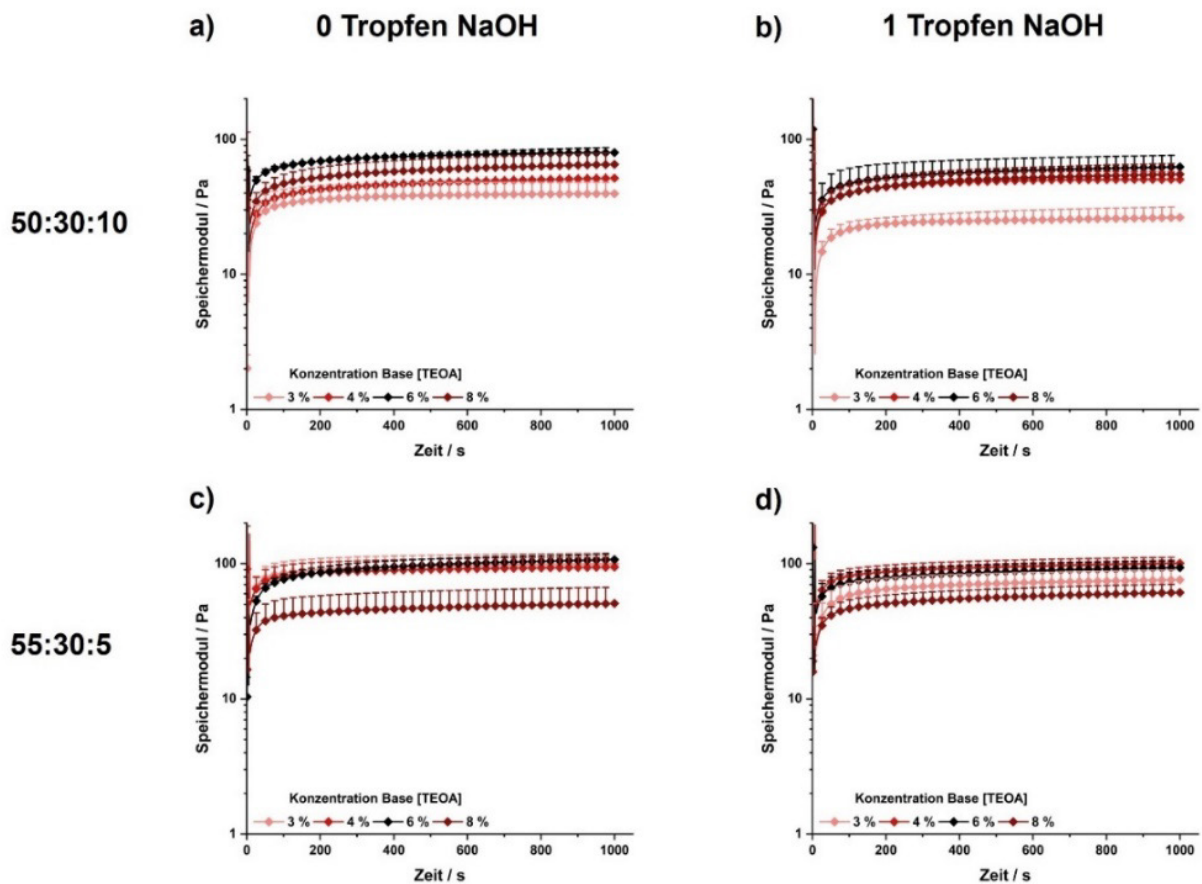


Abbildung 109: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik der Gelatine-Hydrogele anhand des Speichermoduls (G') mit a) 0 Tropfen NaOH und dem Verhältnis 50:30:10, b) 1 Tropfen NaOH (1 M) und dem Verhältnis 50:30:10, c) 0 Tropfen NaOH und dem Verhältnis 55:30:5 und d) 1 Tropfen NaOH (1 M) und dem Verhältnis 55:30:5. Verglichen wurden verschiedene Konzentrationen an TEOA von 3-8 % ($n=3$, $MW \pm SD$).

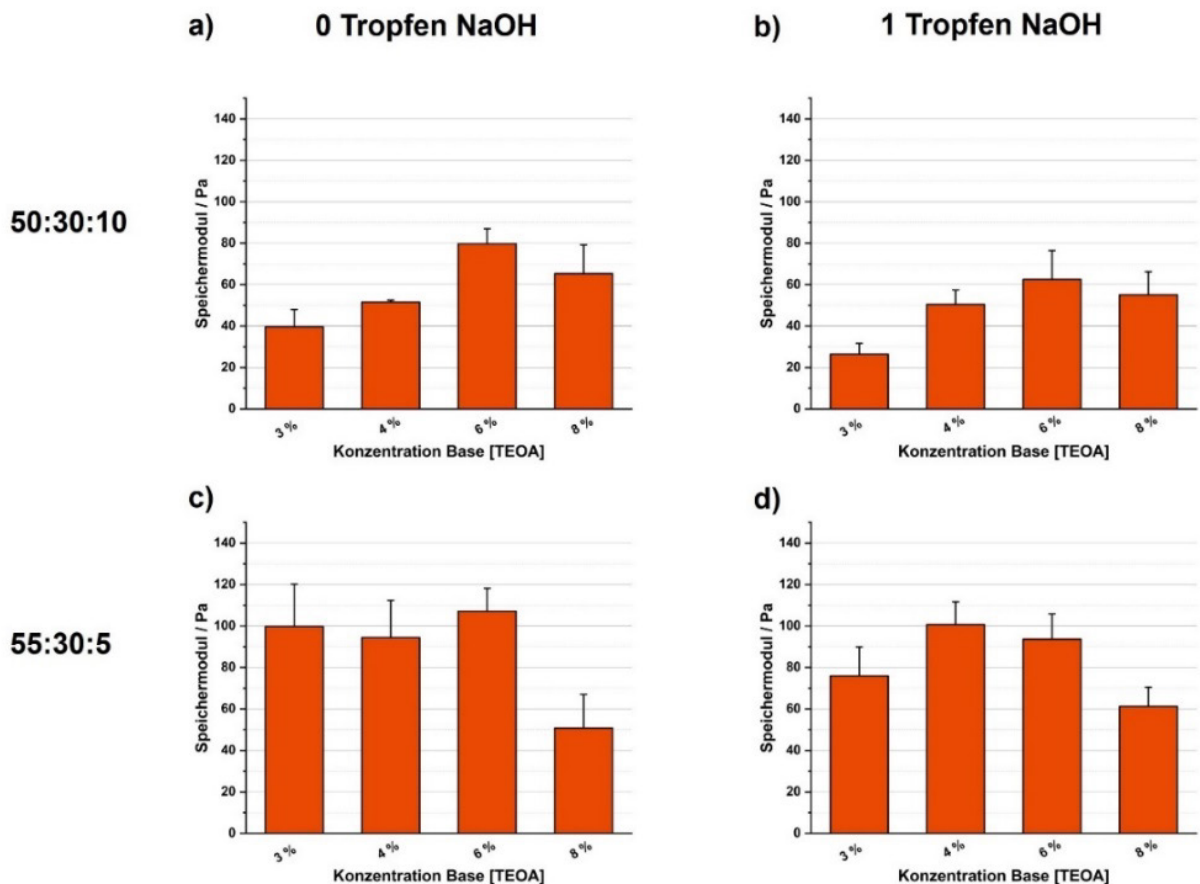


Abbildung 110: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik der Gelatine-Hydrogele anhand des Speichermoduls (G') bei 1000 Sekunden mit a) 0 Tropfen NaOH und dem Verhältnis 50:30:10, b) 1 Tropfen NaOH (1 M) und dem Verhältnis 50:30:10, c) 0 Tropfen NaOH und dem Verhältnis 55:30:5 und d) 1 Tropfen NaOH (1 M) und dem Verhältnis 55:30:5. Verglichen wurden verschiedene Konzentrationen an TEOA von 3-8 % ($n=3$, $MW \pm SD$).

Zusätzlich zu der Gelierungskinetik, wurden auch noch das Trockengewicht, die herauslösbaren Anteile und der Wassergehalt bestimmt. Dabei war es bei dem Verhältnis von 50:30:10 nur bei 6 % und 8 % mit 0 Tropfen NaOH und bei 8 % mit 1 Tropfen NaOH (1 M) möglich Hydrogel-Platten zu erstellen. Die Hydrogel-Platten mit 3 % und 4 % TEOA lösten sich direkt nach der Zugabe von PBS in der Flüssigkeit auf. Bei den Trockengewichten und herauslösbaren Anteilen lagen alle Hydrogele im sehr ähnlichen Bereich. Es ist aber leicht erkennbar, dass mit hier mit steigender Basen-Konzentration, einschließlich der 8%igen, die Stabilität der Hydrogel-Platten zu und der Anteil an herauslösbaren Teilen abnimmt (Abbildung 111). Bei dem Wassergehalt liegen alle Hydrogele zwischen 94 und 95 % (Abbildung 112). Eine Unterscheidung war hier nicht möglich.

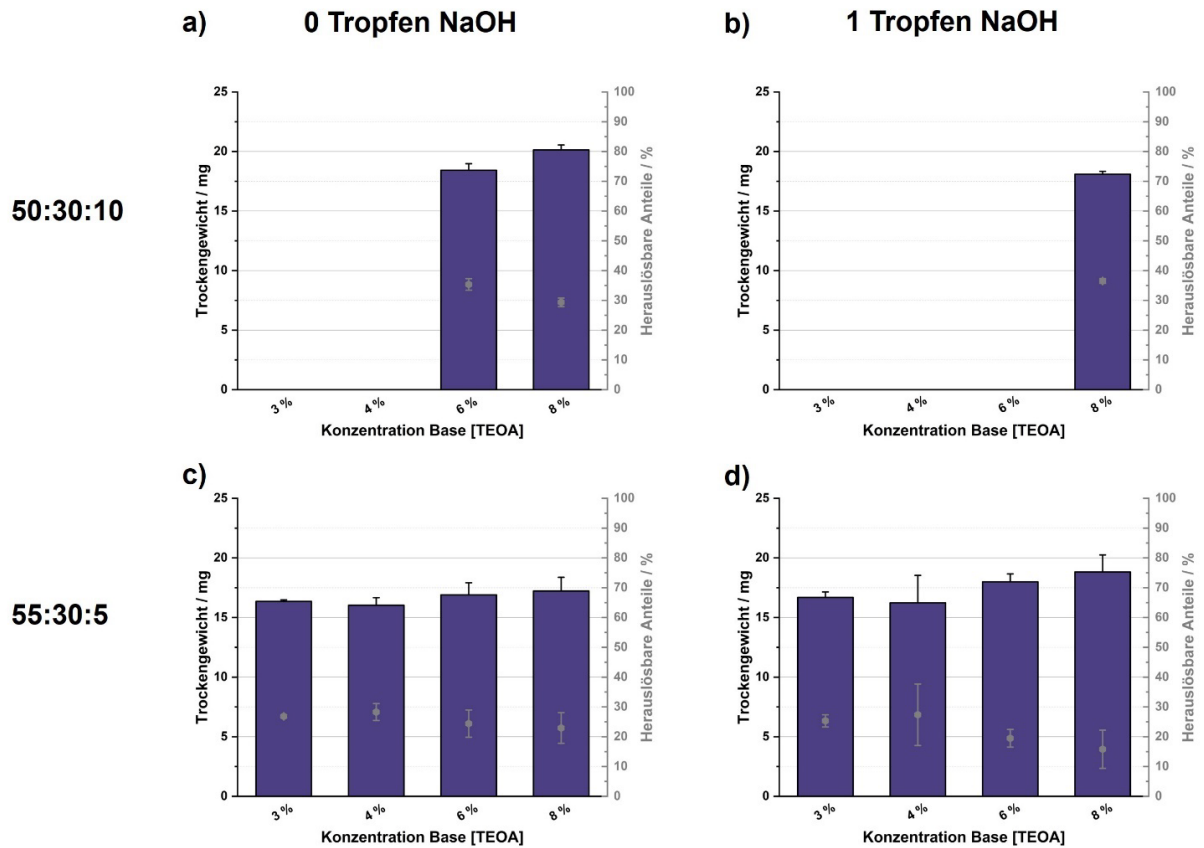


Abbildung 111: Physikochemische Charakterisierung der Hydrogel-Platten der Gelatine-Hydrogele über das Trockengewicht (mg) und die herauslösbaren Anteile (%) mit a) 0 Tropfen NaOH und dem Verhältnis 50:30:10, b) 1 Tropfen NaOH (1 M) und dem Verhältnis 50:30:10, c) 0 Tropfen NaOH und dem Verhältnis 55:30:5 und d) 1 Tropfen NaOH (1 M) und dem Verhältnis 55:30:5. Verglichen wurden verschiedene Konzentrationen an TEOA von 3-8 % (n=3, MW $\pm$ SD).

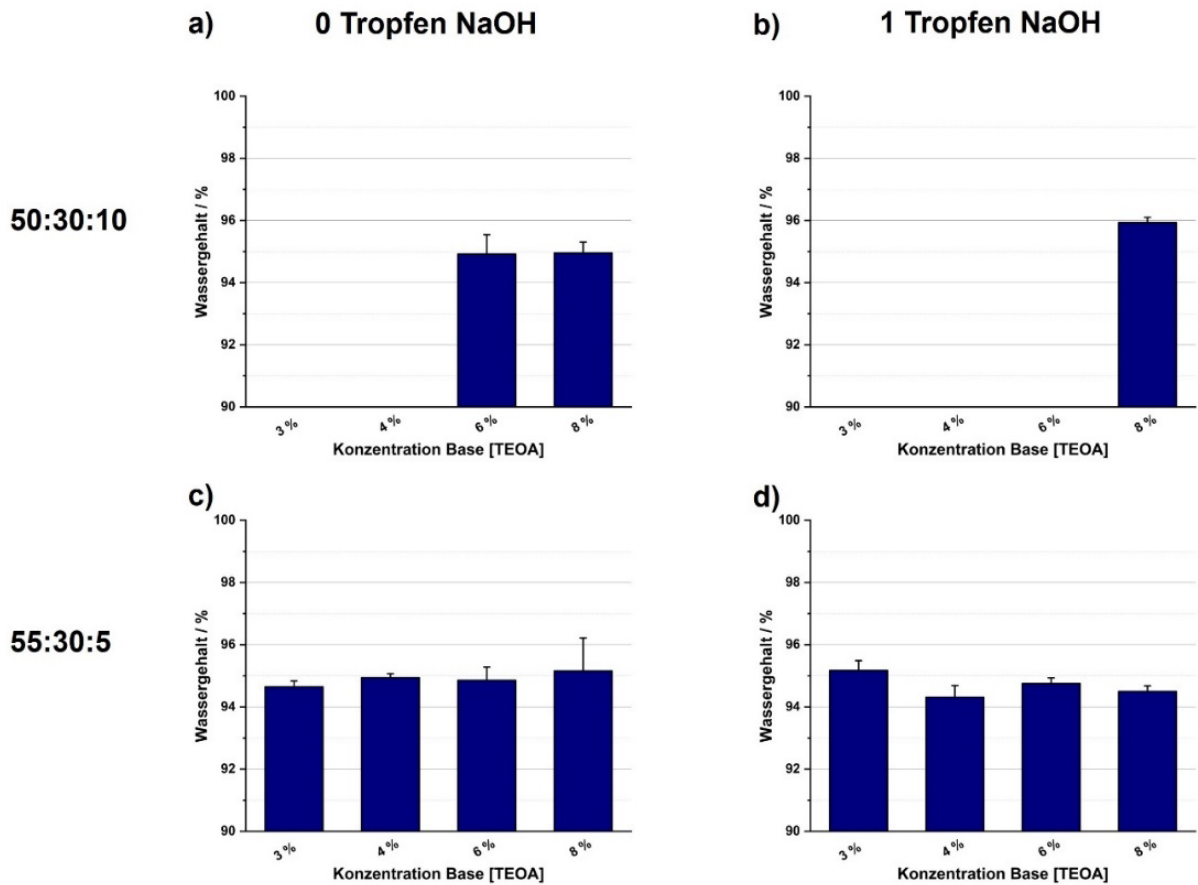


Abbildung 112: Physikochemische Charakterisierung der Hydrogel-Platten der Gelatine-Hydrogele über den Wassergehalt (%) mit a) 0 Tropfen NaOH und dem Verhältnis 50:30:10, b) 1 Tropfen NaOH (1 M) und dem Verhältnis 50:30:10, c) 0 Tropfen NaOH und dem Verhältnis 55:30:5 und d) 1 Tropfen NaOH (1 M) und dem Verhältnis 55:30:5. Verglichen wurden verschiedene Konzentrationen an TEOA von 3-8 % ($n=3$, $MW \pm SD$).

Insgesamt stellte sich heraus, dass eine höhere Basen-Konzentration mit höheren Werten des Speichermoduls (G') und somit in höheren Festigkeiten des Hydrogels resultierte. Dieses Prinzip funktionierte bis zur Sättigung der Basen-Konzentration bei 6 % TEOA. Um dies zu verdeutlichen, wurden in einem Experiment auch Basen-Konzentrationen an TEOA von 1 %, 1,5 %, 2 % und 2,5 % getestet (Abbildung 113). Dabei wurde festgestellt, dass es erst bei einer Konzentration von 3 % zu einer ausreichenden Gelierungsreaktion kommt, bei Werten unter 3 % reicht die Basen-Konzentration nicht für das Abfangen der Protonen in der Gelierungsreaktion aus. Bei 8 % TEOA fällt der Speichermodul (G') ebenfalls wieder ab.

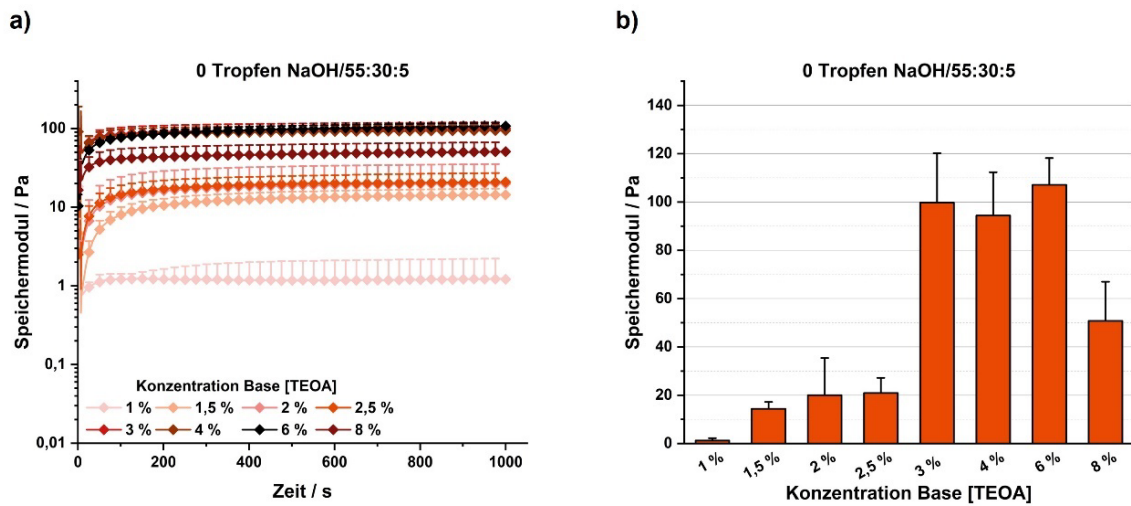


Abbildung 113: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik der Gelatine-Hydrogele anhand des Speichermoduls (G') mit a) 0 Tropfen NaOH und dem Verhältnis 55:30:5 und b) des Speichermoduls bei 1000 Sekunden (G') mit 0 Tropfen NaOH und dem Verhältnis 55:30:5. Verglichen wurden verschiedene Konzentrationen an TEOA von 1-8 % ($n=3$, $MW \pm SD$).

Zusätzlich zu der Betrachtung der rheologischen und physikochemischen Eigenschaften der Hydrogele war auch die Betrachtung des pH-Wertes im Hydrogel für die spätere Einbettung von Zellen von großer Bedeutung. Aus diesem Grund wurde der pH-Wert in allen Zubereitungen mit einer Basen-Konzentration von über 3 % und einer Oligomer-Konzentration von 30 % gemessen (Abbildung 114).

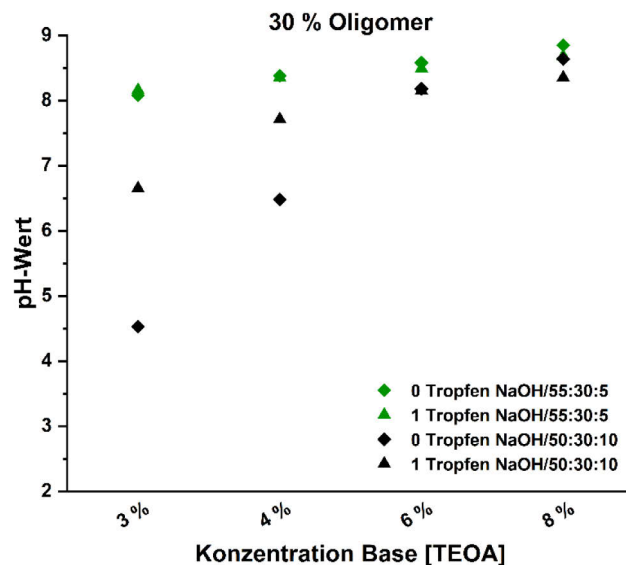


Abbildung 114: pH-Werte bei verschiedenen Basen-Konzentrationen an TEOA von 3-8 %. In grün ist das Verhältnis von 55:30:5 dargestellt und in schwarz von 50:30:10. Verglichen wurden 0 und 1 Tropfen NaOH mit einer 30%igen Oligomer-Lösung von oSMoMA-3,5 ($n=1$).

Dabei zeigte sich, dass die pH-Werte bei dem Verhältnis von 55:30:5 (grün) generell höher lagen als die pH-Werte des Verhältnisses von 50:30:10 (schwarz). In den 90 µl Hydrogel ist die identische Menge an TEOA (30 µl) enthalten, jedoch entscheidet sich die Menge an der Gelatine-Lösung mit 50 µl oder 55 µl. Das bedeutet, dass bei dem Verhältnis 55:30:5 insgesamt mehr Anteil an DMEM enthalten ist, das den pH-Wert des gesamten Hydrogels steigen lässt. Der Tropfen von NaOH (1 M) zeigt nur bei dem Verhältnis von 50:30:10 einen wesentlichen Einfluss und kann bei dem Verhältnis von 55:30:5 vernachlässigt werden. Um als letzten Punkt zu entscheiden, ob mit 0 Tropfen oder 1 Tropfen NaOH (1 M) weitergearbeitet wird, wurde die Zellviabilität der Hydrogele an Tag 1 und 7 bestimmt (Abbildung 115). Dabei zeigte sich, dass es für die Zellviabilität keinen großen Unterschied gibt, ob der Tropfen NaOH zugegeben wird oder nicht. Die Zellviabilität an Tag 7 ohne NaOH-Zugabe liegt sogar leicht über dem mit der NaOH-Zugabe. Aus diesem Grund wurde bei den restlichen Versuchen auf die Zugabe von NaOH verzichtet.

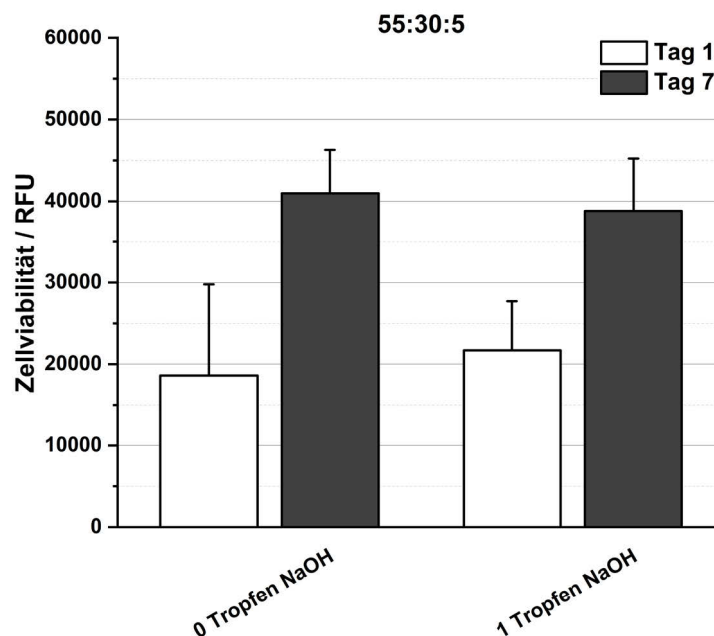


Abbildung 115: Zytokompatibilität der Gelatine-Hydrogele mit den murinen embryonalen 3T3-Fibroblasten und mit dem Verhältnis 55:30:5 über 7 Tage. Verglichen wurden 0 oder 1 Tropfen NaOH (1 M) mit dem PrestoBlue®-Zellviabilitätsreagenz (n=4, MW ± SD).

4.6.4 Auswahl der ersten Biotinte

Nach allen oben genannten Experimenten stand am Ende die erste Biotinte (Abbildung 116) für die Druckversuche mit den eingebetteten Zellen fest. Es wurde das Verhältnis von 55:30:5, eine Oligomer-Konzentration von 30 % (oSMoMA-3,5) und eine Basen-Konzentration an TEOA von 6 % gewählt. Auf eine Zugabe von NaOH (1 M) wurde verzichtet. Damit stellt die entwickelte Biotinte eine Erneuerung dar. Bisher haben vor allem Alginate-Gelatine-Hydrogele als Biotinte breite Anwendung gefunden. Auch die Eigenschaften dieser Biotinte sind durch verschiedene Parameter beeinflussbar. Ermöglicht wird dies dadurch, dass der 3D-Druck dieser Biotinte bereits umfassend erforscht ist, wie die Vielzahl vorhandener Publikationen mit unterschiedlichen Schwerpunkten zeigt. Li *et al.* zum Beispiel konnten die Auswirkungen von verschiedenen Lösungsmitteln, mit unterschiedlicher Ionenstärke, auf die mechanischen Eigenschaften, die Druckbarkeit der Biotinte und die Auswirkungen auf das Verhalten von eingebetteten epidermalen Stammzellen zeigen. Die Eigenschaften der gedruckten Konstrukte konnten hier allein über die Ionenstärke des Lösungsmittels beeinflusst werden [120]. Bociaga *et al.* fokussierten sich hingegen vor allem auf die möglichen Verfahren zur Vorbereitung und Sterilisation dieser Alginate-Gelatine-Hydrogele und die Geschwindigkeit des 3D-Drucks [121], während Chung *et al.* mehr die rheologischen Eigenschaften zwischen der Alginate-Gelatine-Mischung mit vorvernetztem Alginate und Alginate-Lösung verglichen, um die Druckfähigkeit zu ermitteln und damit das optimale Zellwachstum zu erreichen [122].

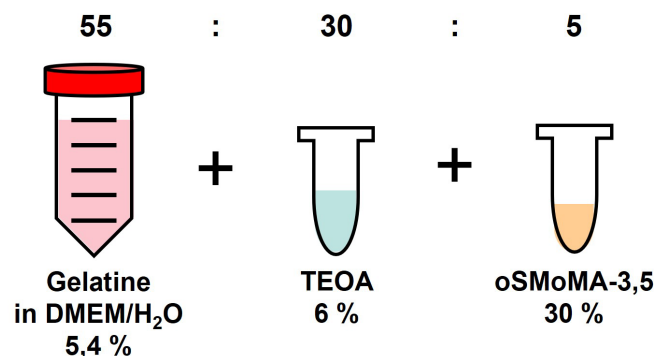


Abbildung 116: Zusammensetzung der ersten Biotinte: Gelatine gelöst in DMEM/H₂O, TEOA 6 % als Base und oSMoMA-3,5 als Oligomer in 30%iger Konzentration.

4.6.5 Austausch der Base

Da es für den 3D-Druck eines Hydrogels interessant ist, verschiedene Gelierungskinetiken zu betrachten, wurde neben dem organischen Triethanolamin (TEOA) noch eine zweite Base ausgewählt und getestet. Dabei fiel die Wahl, angelehnt an Krieghoff *et al.* [20] auf das anorganische Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4). Ein direkter Vergleich der Eigenschaften mit den Hydrogelen von Krieghoff *et al.* ist schwer möglich, da dort eine andere Art von Oligomer (oPNMA) und Imager[®] anstelle von Gelatine verwendet wurden, jedoch zeigten die Hydrogele dort mit K_2HPO_4 im Vergleich zu anderen Basen eine langsamere Gelierungskinetik, was für den 3D-Druck von Vorteil sein kann [20]. Getestet wurden Basen-Konzentrationen an K_2HPO_4 von 6 bis 22 % mit analoger Zusammensetzung wie bei Biotinte Nummer 1 (Abbildung 116). Dabei zeigte sich, dass die Erhöhung der Konzentration an Base zu einer Erhöhung des Speichermoduls (G') und somit zu einer erhöhten Festigkeit des Hydrogels führte. Im Gegensatz zu TEOA, kam es bei K_2HPO_4 zu keiner Sättigung ab einer bestimmten Konzentration.

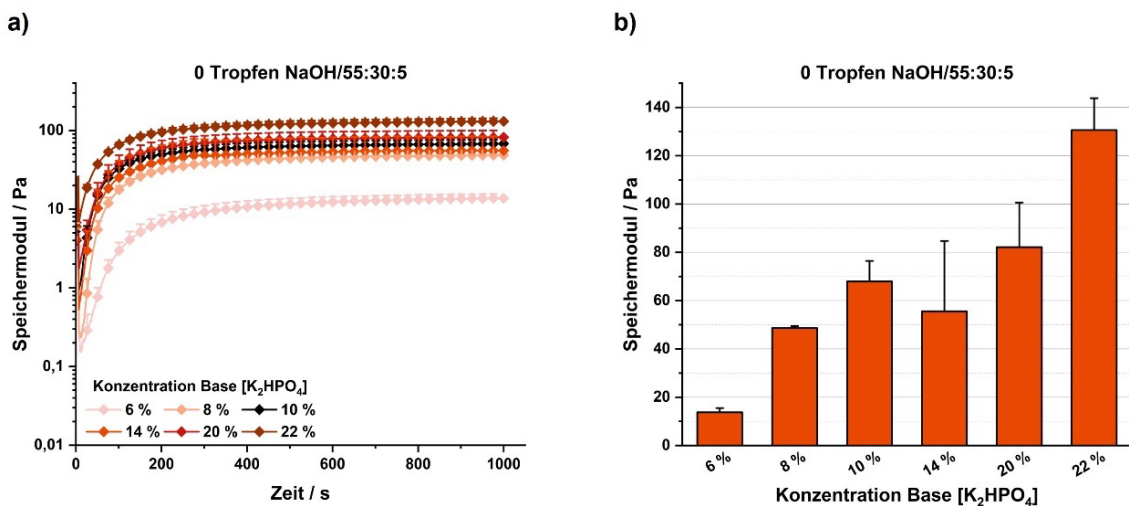


Abbildung 117: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik der Gelatine-Hydrogele anhand des Speichermoduls (G') mit a) 0 Tropfen NaOH und dem Verhältnis 55:30:5 und b) des Speichermoduls bei 1000 Sekunden (G') mit 0 Tropfen NaOH und dem Verhältnis 55:30:5. Verglichen wurden verschiedene Konzentrationen an K_2HPO_4 von 6-22 % ($n=3$, MW $\pm$ SD).

Eine weitere Erhöhung der Konzentration war aber nicht möglich, da es ab 14 % bei der Hydrogel-Herstellung bereits zur Präzipitation des K_2HPO_4 kam. Die Trübung ist in Abbildung 118 erkennbar. Ab einer Konzentration von 14 % trat eine leichte Trübung des Hydrogels ein, bei 22 % hingegen trat eine komplette Trübung ein. Auch bei Krieghoff *et al.* trat die Trübung bei der Zugabe von K_2HPO_4 auf, konnte aber durch 30-sekündiges Mischen wieder aufgehoben werden [20]. Das war hier nicht der Fall. Wie bereits oben erwähnt, handelt es sich bei den Hydrogelen von Krieghoff *et al.* um Hydrogele mit Imagel® als natürliches Biopolymer. Für die Experimente hier wurde Gelatine als natürliches Biopolymer verwendet. Die Ionen von Kalium und Hydrogenphosphat zeichnen sich durch eine hohe Tendenz aus, Ausfällungen zu verursachen [20]. Dies ist in diesem Fall durch Wechselwirkungen mit der Gelatine und den Gelatine Peptiden des Imagels® der Fall. Da es sich bei Imagel® aber um deutlich kürzere Peptidketten handelt [20], die durch die Hydrolyse der Gelatine entstanden sind, ist es in diesem Fall ausreichend die weniger starken Wechselwirkungen beziehungsweise die Bildung von Aggregaten durch 30-sekündiges Mischen aufzuheben. Die Peptidketten der Gelatine können sich vermutlich durch das Mischen wieder besser in der Lösung verteilen. Durch die längeren Ketten der Gelatine und der Möglichkeit dadurch vermehrt Wechselwirkungen beziehungsweise Aggregate auszubilden, führt das 30-sekündige Mischen in diesem Fall nicht zum Auflösen des Präzipitates.

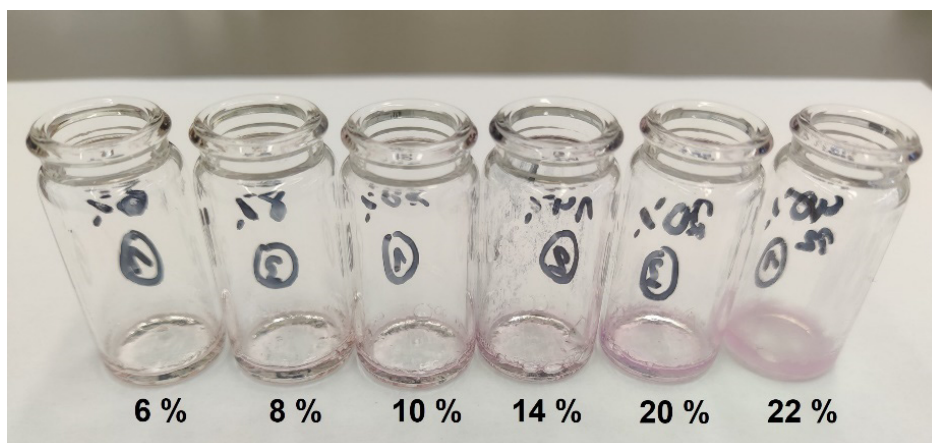


Abbildung 118: Aufnahmen der verschiedenen Konzentrationen an K_2HPO_4 von 6-22 %. Eine zunehmende Trübung bei erhöhter Konzentration ist sichtbar.

Das Trockengewicht der Hydrogel-Platten zeigte ebenfalls eine leichte Erhöhung von 6 bis 22 % K_2HPO_4 und eine Erniedrigung der herauslösbaren Anteile. Die Werte ab 14 % müssen aber aufgrund der Präzipitation von K_2HPO_4 und der inhomogenen Zusammensetzung des Hydrogels kritisch betrachtet werden. Der Wassergehalt nimmt mit steigender Basen-Konzentration an K_2HPO_4 leicht ab, sodass das Hydrogel mit einer Konzentration von 22 % K_2HPO_4 weniger gut in der Lage ist, Wasser zu speichern und zu absorbieren.

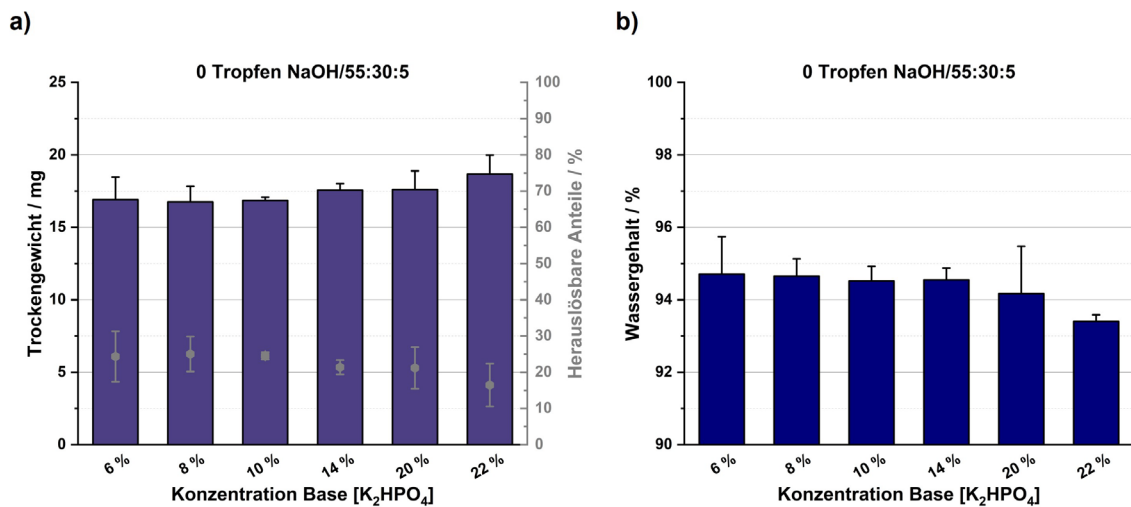


Abbildung 119: Physikochemische Charakterisierung der kleinen Hydrogel-Platten der Gelatine-Hydrogele über a) das Trockengewicht (mg) und die herauslösbaren Anteile (%) und b) den Wassergehalt (%) mit 0 Tropfen NaOH und einem Verhältnis von 55:30:5. Verglichen wurden verschiedene Konzentrationen an K_2HPO_4 von 6-22 % ($n=3$, $MW \pm SD$).

Die pH-Werte der resultierenden Hydrogele lagen alle im selben Bereich (7,5 bis 8,0), sodass der pH-Wert bei der Entscheidung der Basen-Konzentration außen vorgelassen werden konnte (Abbildung 120). Auch Mackenzie *et al.* zeigten bereits, dass ein maximales Zellwachstum im pH-Bereich von 7,38 bis 7,87 stattfindet. Zudem fand bei einem pH-Wert von 8,0 bis 8,2 auch noch ein Wachstum der Zellpopulation mit maximaler Geschwindigkeit innerhalb von 12 bis 24 Stunden statt [123], so dass der pH-Wert in diesem Fall als angemessen betrachtet werden kann.

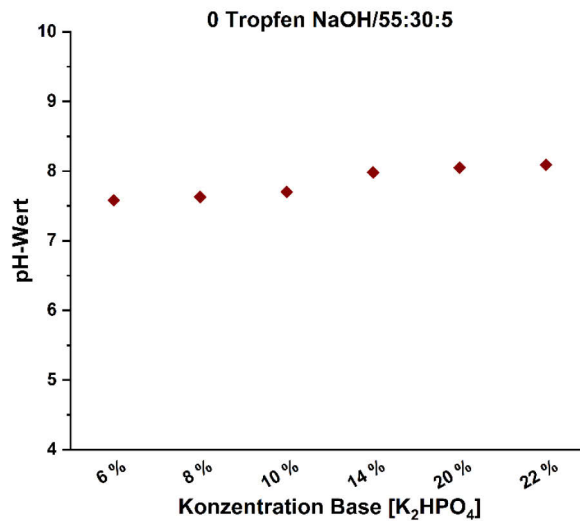


Abbildung 120: pH-Werte bei verschiedenen Basen-Konzentrationen an K_2HPO_4 von 6-22 % mit 0 Tropfen NaOH und einem Verhältnis von 55:30:5. ($n=1$).

4.6.6 Auswahl der zweiten Biotinte

Aus dem Grund, dass es ab einer Konzentration von 14 % an K_2HPO_4 zu einer Trübung während der Reaktion kam, wurde als zweite Biotinte die Zusammensetzung mit 10 % K_2HPO_4 gewählt (Abbildung 121). Die 10%ige Basen-Konzentration zeigte im Gegensatz zu den anderen möglichen Konzentrationen die besten Eigenschaften zur Eignung als Biotinte.

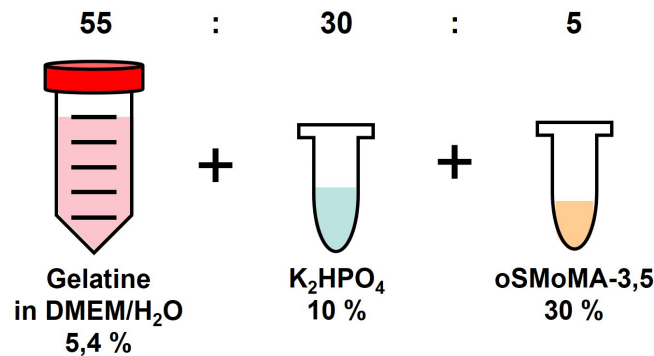


Abbildung 121: Zusammensetzung der zweiten Biotinte: Gelatine gelöst in DMEM/H₂O, K_2HPO_4 10 % als Base und oSMoMA-3,5 als Oligomer in 30%iger Konzentration.

4.6.7 Gelierungskinetik und Viskosität der Biotinten

Das Ziel mit der Verwendung von K_2HPO_4 anstelle von TEOA war eine langsamere Gelierungsreaktion, wie auch Krieghoff *et al.* es beschrieben hatten [20]. Dies konnte mit einem vergleichenden zeitabhängigen Oszillationstest gezeigt werden (Abbildung 122). Auf der rechten Seite sieht man, dass das Hydrogel mit K_2HPO_4 als Base die höheren Speichermodule (G') deutlich langsamer erreicht als das Hydrogel mit TEOA als Base. Das Plateau im Speichermodul (G') tritt bei TEOA schon nach etwa 100 Sekunden ein, während es bei K_2HPO_4 etwa 400 Sekunden dauert. Der Phasenwinkel (P), der das Verhältnis von G' zu G'' darstellt, beginnt bei K_2HPO_4 auch bei deutlich höheren Werten, was noch für den flüssig fluiden Zustand spricht, und sinkt verglichen zu TEOA erst deutlich später in den festen gel-artigen Bereich ab. Es konnten folglich zwei Biotinten mit unterschiedlichen Gelierungskinetiken entwickelt werden.

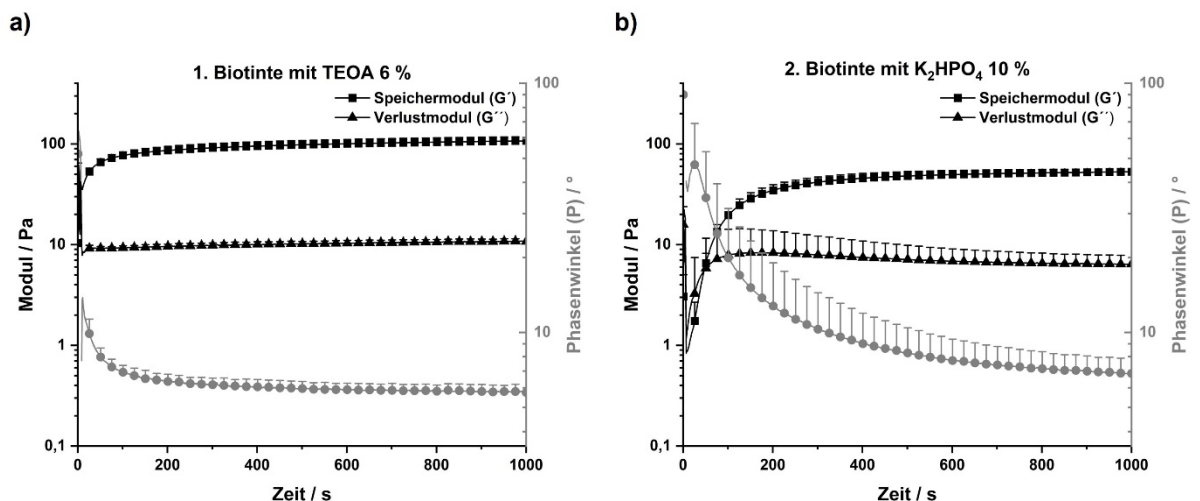


Abbildung 122: Rheologische Charakterisierung der Gelierungskinetiken der Gelatine-Hydrogele mit Speichermodul (G'), Verlustmodul (G'') und dem Phasenwinkel (P) und a) TEOA 6 % als Base und b) K_2HPO_4 10 % als Base ($n=3$, $MW \pm SD$).

Vergleicht man die komplexen Viskositäten der beiden finalen Biotinten (Abbildung 123) zeigen sich auch dort Unterschiede zwischen den Basen. Analog zu den Speichermodulen (G') zeigt auch die komplexe Viskosität höhere Werte mit TEOA 6 % als Base. Zwischen 500 Sekunden und 1000 Sekunden sind kaum Unterschiede erkennbar, sodass die Gelierung der beiden Biotinten wahrscheinlich schon bei 500 Sekunden nahezu vollständig abgeschlossen ist.

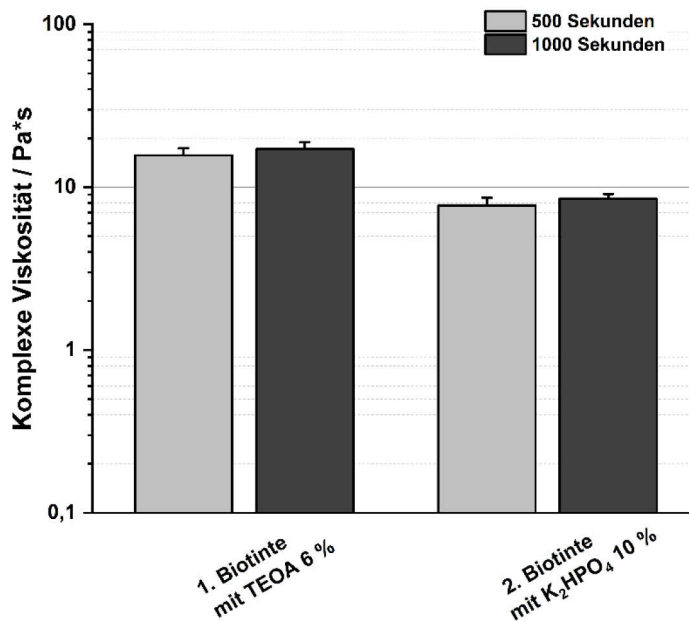


Abbildung 123: Komplexe Viskositäten der beiden Biotinten bei 500 Sekunden (hellgrau) und 1000 Sekunden (dunkelgrau). Gemessen wurde bei 1 Hz Frequenz und einer Amplitude von 0,05 % ($n=3$, $MW \pm SD$).

4.6.8 Design of Experiment (DoE)

Um die Konzentrationen der Komponenten des Gelatine-Hydrogels bei der Entwicklung der ersten Biotinte mit TEOA zu überprüfen, wurde eine statistische Versuchsplanung mit 3 Faktoren (Konzentration der Gelatine-Lösung, Konzentration der Base und Konzentration der Oligomer-Lösung im Hydrogel) durchgeführt. Die statistische Versuchsplanung ist eine Methode, um Ursache-Wirkung-Beziehungen mit erforderlicher Genauigkeit und möglichst geringem Aufwand, zu bestimmen [94]. Dafür wurden 17 Läufe am Oszillationsrheometer durchgeführt und die Ergebnisse erhalten, die in Abbildung 124 zu sehen sind. Betrachtet wurde die resultierende Festigkeit der Hydrogele mit dem Speichermodul (G') als Indikator. Wie Abbildung 124d zeigt, erreicht das Experiment eine hohe Reproduzierbarkeit. Das bedeutet, dass die Center Points, die an unterschiedlichen Tagen bestimmt worden sind, innerhalb der 17 Läufe, gut reproduziert werden konnten. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) des Kalibrations-Plots (Abbildung 124b) der Vorhersage des Speichermoduls (G') liegt mit einem Wert von 0,827 im akzeptablen Bereich. Die Güte der Vorhersage (Q^2) ist mit einem Wert von 0,494 aber eher gering. Unter der Berücksichtigung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse kann dies allerdings auch auf eine geringe

Eignung des verwendeten Modells zurückzuführen sein. Der Koeffizienten-Plot in Abbildung 124a wurde, anhand der autotunen Funktion von Modde, auf die signifikanten Einflüsse reduziert und verdeutlicht, dass die Oligomer-Konzentration den stärksten Einfluss auf die Festigkeit des Hydrogels zeigt. Darauf folgt die Gelatine-Konzentration. Die Erhöhung der Basen-Konzentration allein zeigt dagegen keinen signifikanten Effekt auf die Festigkeit des Hydrogels, denn erst bei der Kombination aus der Erhöhung der Oligomer-Konzentration mit der Basen-Konzentration wird der Effekt sichtbar (Base*Olig.). Das bedeutet, dass der Effekt der Oligomer-Konzentration auf die Festigkeit des Hydrogels immer auch von der Basen-Konzentration und somit auch von dem pH-Wert abhängig ist. Die Konzentration der Base in dem System, die als Protonenfänger dient, sollte so hoch sein, dass ein pH-Wert erreicht wird, der keinen negativen Einfluss auf die Quervernetzungsreaktion zeigt. Der Konturen-Plot in Abbildung 124c zeigt, dass bei gleichbleibender Basen-Konzentration die höchsten Speichermodule (G') mit einer erhöhten Konzentration an Gelatine und Oligomer erreicht werden können. Mit abnehmenden Konzentrationen nimmt auch der Speichermodul (G') ab, sodass die Oligomer-Konzentration den größten Einfluss auf die Festigkeit des Hydrogels zeigt. Erniedrigt man die Konzentration an Oligomer nimmt der Speichermodul (G') im Konturen-Plot deutlich schneller geringere Werte an als bei Erniedrigung der Gelatine-Konzentration. Die Basen-Konzentration wurde hier gleichgehalten, da sie im Koeffizienten-Plot den geringsten Effekt zeigte. Die hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zeigt, dass die statistische Versuchsplanung auch zur rheologischen Bestimmung der Festigkeit von Hydrogelen eingesetzt werden kann. Das Endergebnis zeigt, dass vor allem eine erhöhte Oligomer-Konzentration und eine erhöhte Gelatine-Konzentration zu einer verbesserten Festigkeit des Gelatine-Hydrogels führt. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Hydrogel-Zusammensetzung noch verschiedene weitere Anforderungen erfüllen muss. Höhere Konzentrationen an Oligomer könnten beispielsweise einen negativen Einfluss auf die Zellviabilität zeigen. Wie Abbildung 80 in Kapitel 4.5.1 zeigt, weist die Zusammensetzung mit der 30 %igen Oligomer-Lösung eine höhere Zellviabilität auf als die 60 %ige Oligomer-Lösung. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Stabilität des pH-Wertes, der idealerweise im physiologischen Bereich um 7,4 liegen sollte, um optimale Bedingungen für Zellwachstum und -funktion zu

gewährleisten [124]. Jede Konzentrationsänderung einer Komponente könnte dabei einen Einfluss auf den pH-Wert der finalen Zusammensetzung haben. Zudem könnten Hydrogele mit einer zu hohen Festigkeit durch eine hohe Vernetzungsdichte ebenfalls die Biokompatibilität beeinträchtigen [125]. Die Erkenntnisse aus der statistischen Versuchsplanung als Experiment waren aus diesem Grund ein guter Anhaltspunkt, stellen jedoch nur einen kleinen Teil dar, der für die Auswahl der ersten Biotinte entscheidend war.

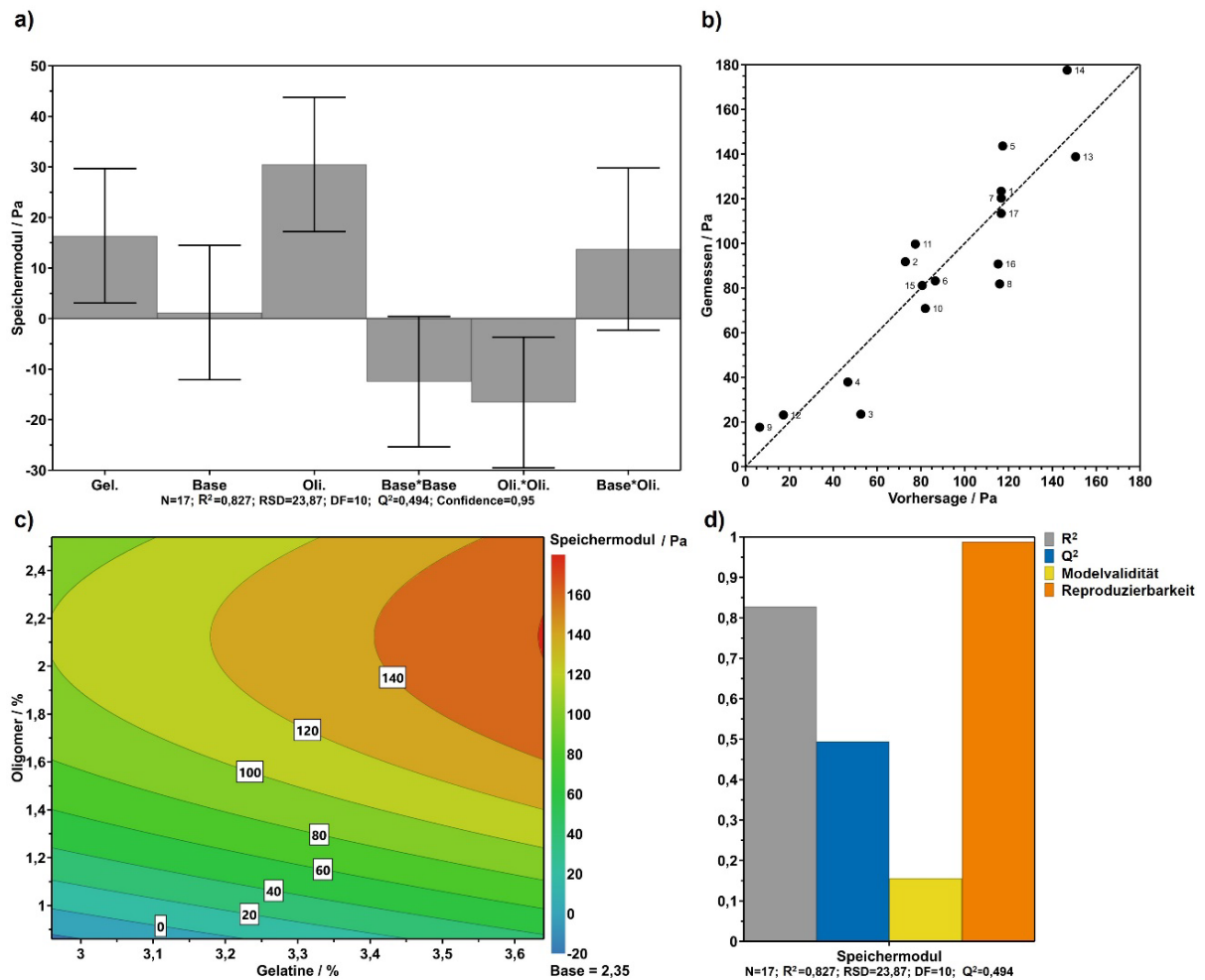


Abbildung 124: Ergebnisse CCC-Versuchsplan mit a) Koeffizienten-Plot (Fehlerbalken stellen das 95%ige Konfidenzintervall dar, Gel. =Gelatine, Oli.=Oligomer), b) Kalibrations-Plot, c) Konturen-Plot mit Gelatine- und Oligomer-Konzentration bei einer feststehenden Basen-Konzentration von 2,35 % und d) die Zusammenfassung der Eignung des Versuchsplans mit R², Q², der Modelvalidität und der Reproduzierbarkeit des Experimentes.

4.7 Zellviabilität

4.7.1 Vergleich der Zellviabilitätsreagenzien PrestoBlue® und WST-8

Für den Vergleich der beiden Zellviabilitätsreagenzien PrestoBlue® und WST-8 wurden die Gelatine-Hydrogele mit dem Verhältnis 55:30:5 µl genutzt. Als Base wurde Triethanolamin 6 % und als Oligomer oSMoMA-3,5 (30 % in DMSO) verwendet. Die murinen embryonalen 3T3-Fibroblasten wurden wie oben beschrieben kultiviert und das Assay anschließend durchgeführt. Bei Fibroblasten handelt es sich um Zellen, die anatomisch vielfältig sind, ein breites Spektrum an Organfunktionen unterstützen und EZM-reiche Bindegewebe bilden [126]. Aus diesem Grund wurde diese Art an Zelllinie für weitere Versuche und das Nachahmen der EZM genutzt. Die Hydrogele mit selbst synthetisiertem Oligomer wurden mit einem Rattenschwanz-Kollagen-Hydrogel als Standard verglichen. Orientiert wurde sich an Wiebe-Ben Zakour *et al.*, die ebenfalls ein neuartiges Tränendrüsen-Hydrogel mit dem Rattenschwanz-Kollagen verglichen. Dabei handelt es sich um ein unspezifisches Einkomponenten-Hydrogel aus Kollagen-Typ 1 [127]. Das PrestoBlue® nutzt dabei die Reduktionskraft lebender Zellen, um den Farbstoff Resazurin (blau) in fluoreszierendes Resofurin (violett) umzuwandeln [128]. Das WST-8 hingegen wirkt als Akzeptor für die NADH/NADPH-Dehydrogenase (in lebenden Zellen) und wird zu Formazan (orange) reduziert [129]. In Abbildung 125 sieht man jeweils 4 verschiedene Proben (n=4), wobei in Reihe 5 und 6 die Blindproben ohne lebende Zellen vorliegen und von den anderen Proben durch die Farbe abgegrenzt werden können.

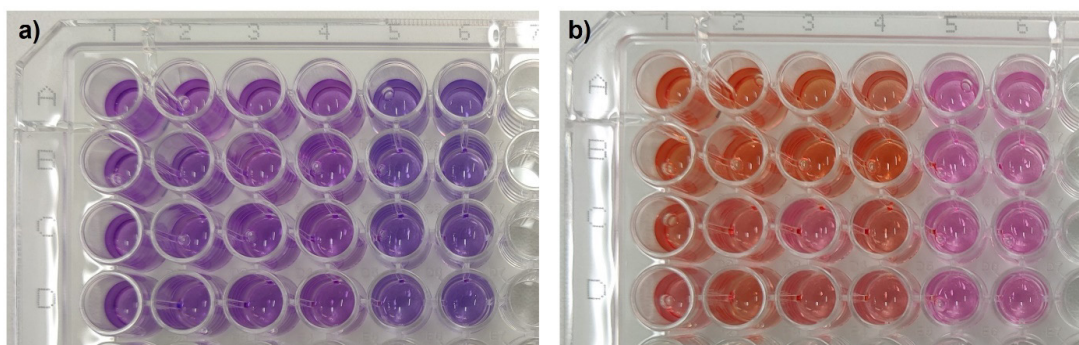


Abbildung 125: 24-er Mikrotiterplatten mit a) PrestoBlue® als Zellviabilitätsreagenz und b) WST-8 als Zellviabilitätsreagenz. In den ersten 4 Reihen (1-4) befinden sich jeweils Proben, die Zellen enthalten und in Reihe 5 und 6 befinden sich die Blindproben ohne Zellen.

An den Zellviabilitätsdaten in Abbildung 126 kann man erkennen, dass das Hydrogel mit dem selbst synthetisiertem oSMoMA-3,5 in Bezug auf die Zellviabilität bessere Ergebnisse zeigt als das Vergleichsgel aus dem Rattenschwanz-Kollagen. Es sieht zudem so aus, als würde die Zellviabilität beim Rattenschwanz-Kollagen über die 7 Tage abnehmen, wohingegen sie beim Hydrogel mit oSMoMA-3,5 stark zunimmt. Das ist für beide Zellviabilitätsreagenzien der Fall. Zudem sehen die Tendenzen der Erhöhung der Zellviabilität von Tag 1 bis Tag 7 bei dem Hydrogel mit oSMoMA-3,5 für beide Reagenzien sehr ähnlich aus. Bei dem Rattenschwanz-Kollagen hingegen, gibt es bei Tag 3 einen Unterschied. Aufgrund der einfacheren Handhabbarkeit und der geringeren Standardabweichungen, wurde für die restlichen Zellversuche (außer dem Langzeitexperiment) WST-8 als Zellviabilitätsreagenz verwendet.

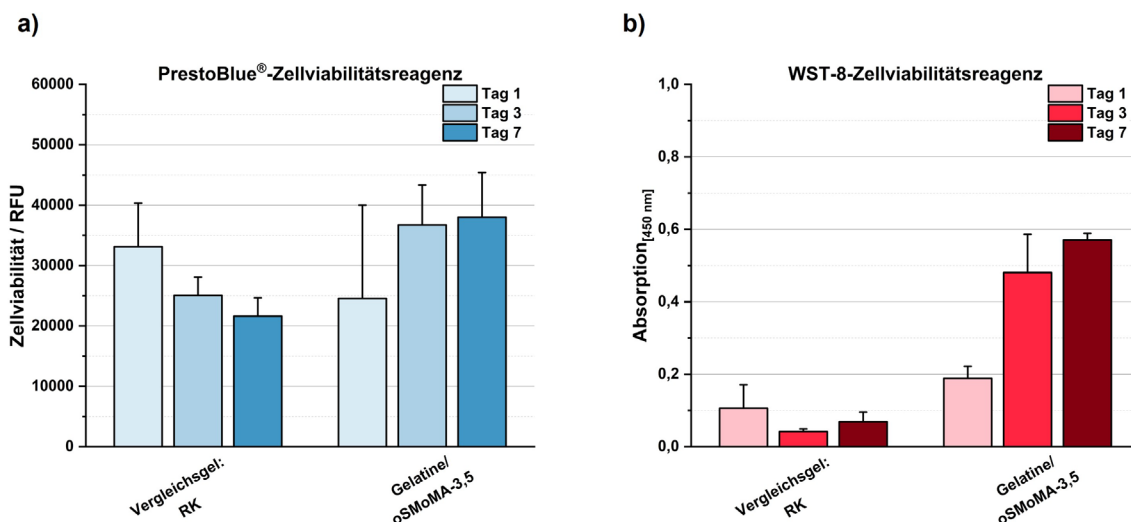


Abbildung 126: Zytokompatibilität der Gelatine-Hydrogele mit den murinen embryonalen 3T3-Fibroblasten und mit a) PrestoBlue® als Zellviabilitätsreagenz und b) WST-8 als Zellviabilitätsreagenz über 7 Tage. Verglichen wurden das Vergleichsgel aus dem Rattenschwanz-Kollagen mit einem Hydrogel bestehend aus Gelatine, oSMoMA-3,5 in einer 30%igen Lösung, sowie TEOA 6 % als Base (n=4, MW $\pm$ SD).

In Abbildung 127 sind Aufnahmen vom Durchlichtmikroskop (mit differentiellem Interferenzkontrast) der Zellen 3T3-Zellen in der Flasche (a), im Hydrogel (c) bzw. einmal das Hydrogel ohne Zellen (b) zu sehen. Die pinke Färbung des reinen Hydrogels kommt durch das Phenolrot, welches im DMEM enthalten ist, die orangene Farbe des Hydrogels mit Zellen resultiert aus dem Umsatz der lebenden Zellen zu WST-8-Formazan. In Abbildung 127c ist deutlich zu erkennen, dass die Zellen die Hydrogel-Struktur übernehmen und flächendeckend im Hydrogel proliferieren. Das reine Hydrogel hingegen zeigt eine sehr inhomogene äußere Struktur und keine glatte Oberfläche.

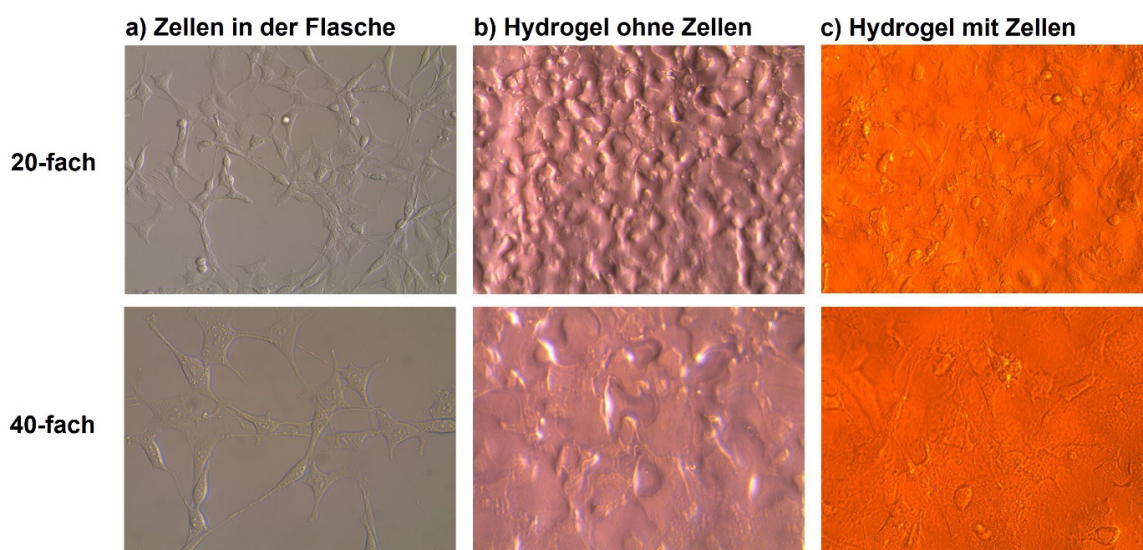


Abbildung 127: Mikroskopische Aufnahmen am Durchlichtmikroskop (mit differentiellem Interferenzkontrast) der a) Zellen in der Flasche ohne Hydrogel, b) dem Hydrogel ohne Einbettung der Zellen und c) dem Hydrogel mit eingebetteten Zellen nach 3 Tagen. Die orangene Farbe kommt durch enthaltenes WST-8, welches von lebenden Zellen zu WST-8-Formazan umgesetzt wird. In der oberen Reihe befinden sich die Aufnahmen mit 20-facher Vergrößerung und unten die Aufnahmen mit 40-facher Vergrößerung.

4.7.2 Langzeitexperiment

Bei dem Langzeitexperiment wurden humane Fibroblasten in zwei Experimenten über 21 Tage im gleichen Hydrogel wie bei 4.7.1 betrachtet. Das erste Experiment umfasste Tag 1, 2, 5 und 7. Das zweite Experiment Tag 7, 14 und 21. Als Zellviabilitätsreagenz wurde hier PrestoBlue® verwendet. An den Zellviabilitätsdaten (Abbildung 128) lässt sich deutlich erkennen, dass die Zellviabilität auch über die 7 Tage hinaus zunimmt und auch bei 21 Tagen noch eine deutliche Steigerung vorliegt. Mit diesem Experiment wurde bewiesen, dass die Zellen bis zu 21 Tage in dem *in situ* hergestellten Zweikomponenten-Hydrogel mit dem selbst synthetisierten Oligomer (oSMoMA-3,5) überleben können und proliferieren. In der Literatur findet man Daten zur Zellviabilität meistens nur über einen Zeitraum von 7 Tagen. Dubbin *et al.* zeigten die Überlebensrate der 3T3-Fibroblasten und hASC-Zellen über 7 Tage in einem modifizierten Alginat-Hydrogel [130]. Ebenso wie Park *et al.*, die auch nur 7 Tage für ihr Alginat-Hydrogel in Betracht zogen [131]. Eine Verlängerung der Überlebensdauer auf 21 Tage könnte einen vielversprechenden Ansatz bei der Entwicklung einer Biotinte darstellen.

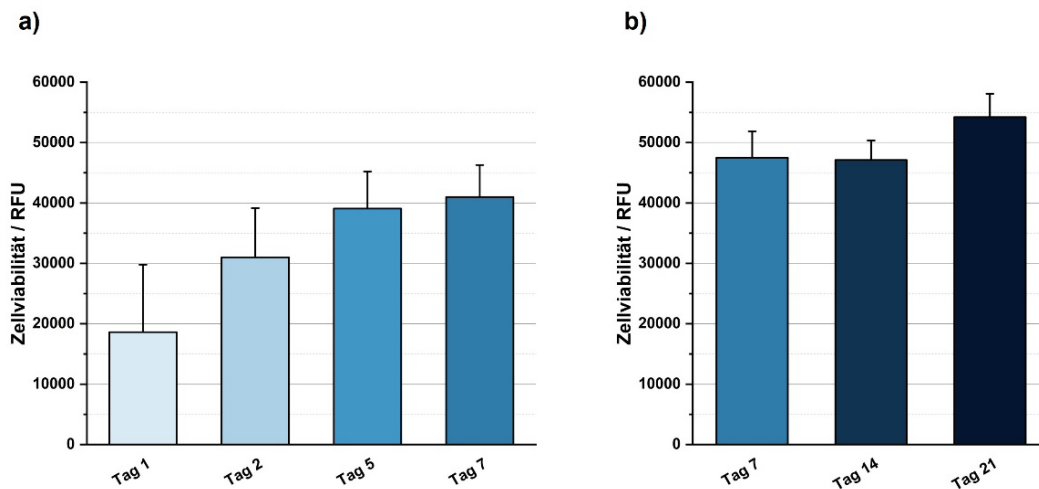


Abbildung 128: Zytokompatibilität der Gelatine-Hydrogele mit der humanen Fibroblasten-Zelllinie für a) 1-7 Tage und b) 7-21 Tage. Als Zellviabilitätsreagenz für die Langzeitversuche diente PrestoBlue®. Die Base war TEOA 6 % und als Oligomer wurde eine 30%ige Lösung von oSMoMA-3,5 genutzt ($n=4$, $MW \pm SD$).

4.7.3 Untersuchungen mit Mesenchymalen Stammzellen

Für das Experiment wurden Mesenchymale Stammzellen aus der Tränendrüse des Schweins verwendet und nach der Methode von Wiebe-Ben-Zakour isoliert und vorbereitet [127]. Mesenchymale Stammzellen und Fibroblasten stellen verschiedene Zelltypen dar. Fibroblasten sind entscheidend für die Erhaltung der Struktur und Funktion des Gewebes, da sie den Großteil der Zellen im Stroma, dem strukturellen Gerüst, ausmachen. Sie sind hauptsächlich dafür verantwortlich, extrazelluläre Matrixmoleküle wie zum Beispiel Kollagen oder Proteoglykane aktiv zu sezernieren. Da Kollagen der Hauptbestandteil von Geweben wie Knochen, Knorpel und Haut ist, sind Fibroblasten entscheidend, um diese Gewebe zu entwickeln, zu erhalten und zu reparieren. Mesenchymale Stammzellen sind gewebeeigene Vorläuferzellen mit einem hohen Potential zur Differenzierung, die sich im Gegensatz zu den Fibroblasten eher im Ruhezustand befinden. Bei bestimmten Reizen, wie zum Beispiel einer Gewebeverletzung, reagieren mesenchymale Stammzellen aber sofort. Dies führt zu ihrer Aktivierung und Vermehrung sowie zu ihrer Differenzierung in spezialisierte Zelltypen, die für die Regeneration des Gewebes nach einer Verletzung notwendig sind [132]. Da es sich bei mesenchymalen Stammzellen mit hoher Selbsterneuerungskapazität, einem großen Differenzierungspotential und immunmodulatorischen Eigenschaften um spezielle Zelltypen handelt, ist die Ermittlung optimaler Kulturbedingungen von großer Bedeutung. Diese umfassen die Zusammensetzung des Mediums, die Dichte der Zellaussaat und die physikalisch-chemischen Umgebungsbedingungen, wie die Konzentrationen an gelöstem Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid, den pH-Wert und die Temperatur [133]. Aus diesem Grund wurde für die mesenchymalen Stammzellen α -MEM anstelle von DMEM als Nährmedium verwendet. Trotz der insgesamt höheren Nährstoffkonzentrationen in DMEM im Vergleich zu α -MEM, ist DMEM aufgrund der niedrigeren Konzentrationen an Aminosäuren und Vitaminen weniger nährstoffreich für Zellen. [110]. Daher musste in einem ersten Experiment überprüft werden, ob es Unterschiede bei der Gelierungskinetik und den resultierenden Eigenschaften des Hydrogels geben könnte.

4.7.3.1 Austausch von DMEM gegen α -MEM

Um Unterschiede zwischen den Hydrogelen festzustellen, wurde die Gelierungskinetik, der Frequenztest, das Trockengewicht, die herauslösbaren Anteile, der Wassergehalt und die pH-Werte der Lösungen und Hydrogele miteinander verglichen. Dazu wurde wie oben das Gelatine-Hydrogel mit dem Verhältnis 55:30:5 μ l genutzt. Als Basen wurden Triethanolamin 6 % und K_2HPO_4 10 % und als Oligomer oSMoMA-3,5 (30 % in DMSO) verwendet. Es wurden beide Biotinten getestet, um ein späteres Austauschen der Zelllinie beim Zelldruck am 3D-Drucker zu ermöglichen. Bei den Kurven des Speichermoduls (G') für die Gelierungskinetik und bei dem Ergebnis des Frequenztests der Hydrogel-Platte (bei 1 Hz) erkennt man, dass der Austausch von DMEM gegen α -MEM bei beiden Basen zu einer Erhöhung des Speichermoduls (G') und somit der Festigkeit des Hydrogels führt. Dabei liegen die Hydrogele mit TEOA 6 % als Base aber in beiden Fällen, unabhängig vom Nährmedium, über den Hydrogelen mit K_2HPO_4 10 % als Base (Abbildung 129). TEOA 6 % als organische Base scheint also in diesem Fall der bessere Protonenfänger für die Reaktion zu sein.

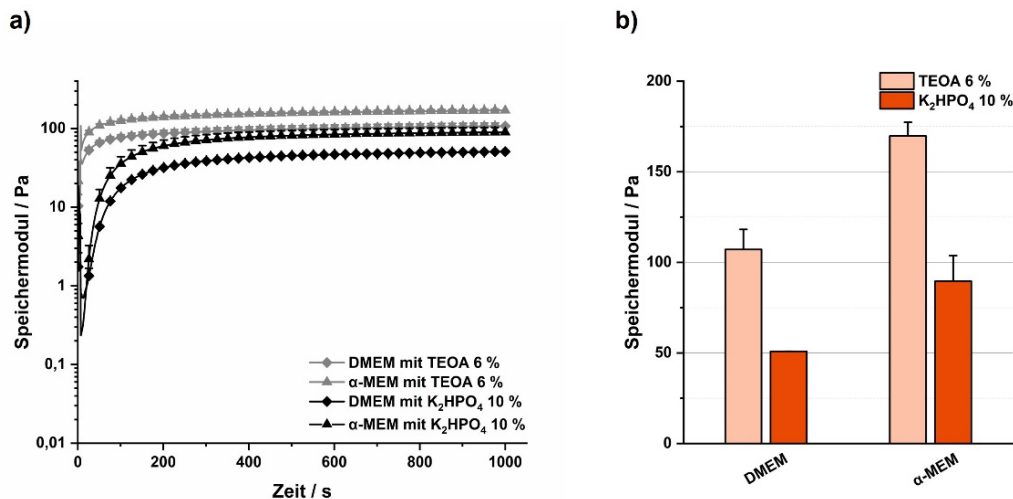


Abbildung 129: Rheologische Charakterisierung (zeitabhängiger Oszillationstest) der Gelierungskinetik der Gelatine-Hydrogele (mit oSMoMA-3,5) anhand des Speichermoduls (G') mit a) beiden Basen (TEOA 6 % und K_2HPO_4 10 %) und b) des Speichermoduls bei 1000 Sekunden (G') mit (TEOA 6 % und K_2HPO_4 10 %). Verglichen wurden DMEM (grau) und α -MEM (schwarz) als Nährmedium für die Zellen ($n=3$, MW $\pm$ SD).

Bei dem Trockengewicht, den herauslösbaren Anteilen und dem Wassergehalt der Hydrogel-Platten sind die Unterschiede hingegen nicht so groß (Abbildung 130). Bei dem Trockengewicht liegen die Hydrogele mit α -MEM leicht über denen mit DMEM und die herauslösbaren Anteile darunter, sodass sich auch hier eine bessere Stabilität der Hydrogele mit α -MEM zeigt. Im Gegensatz zu der Gelierungskinetik haben hier die Hydrogele mit K_2HPO_4 10 % die höhere Stabilität verglichen mit Hydrogelen mit TEOA 6 %. Das bedeutet direkt nach der Herstellung scheinen die Hydrogele mit TEOA 6 % stabiler zu sein, nach einigen Trocknungs- und Waschschritten aber die mit K_2HPO_4 10 % als Base. Beim Wassergehalt gibt es keinen erkennbaren Trend zwischen α -MEM und DMEM. Die Hydrogele mit TEOA 6 % liegen mit α -MEM unter denen des DMEMs und beim K_2HPO_4 10 % genau andersherum - allerdings sind die Unterschiede gering.

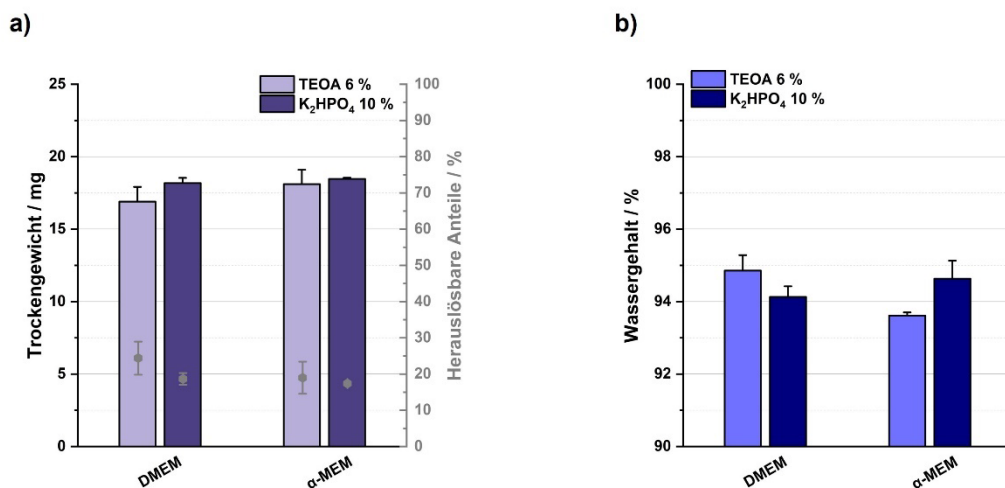


Abbildung 130: Physikochemische Charakterisierung der kleinen Hydrogel-Platten der Gelatine-Hydrogele über a) das Trockengewicht (mg) und die herauslösbaren Anteile (%) und b) den Wassergehalt (%) mit beiden Basen (TEOA 6 % und K_2HPO_4 10 %). Verglichen wurden DMEM (hellblau) und α -MEM (dunkelblau) als Nährmedium für die Zellen ($n=3$, MW $\pm$ SD).

Die pH-Werte wurden jeweils von dem Nährmedium allein, dem Nährmedium mit Gelatine (Endkonzentration 5,4 %, 1:2 verdünnt) und dem Hydrogel gemessen (Abbildung 131). Dabei zeigt sich, dass die pH-Werte von reinem DMEM und reinem α -MEM sehr nah beieinander liegen. In der Literatur ist für beide Nährmedien ein pH-Wert von 7,4 bzw. 7,45 beschrieben worden [134, 135]. In Kombination mit der Gelatine zeigt sich, dass DMEM kombiniert mit Gelatine einen leicht höheren pH-Wert im Gegensatz zu α -MEM mit Gelatine aufweist.

Dies zeigt sich auch im Hydrogel, wo die Werte der Hydrogele mit α -MEM auch unter denen mit DMEM liegen. Zusätzlich zeigen die Hydrogele mit TEOA 6 %, unabhängig vom Nährmedium, höhere pH-Werte als die Hydrogele mit K_2HPO_4 10 %.

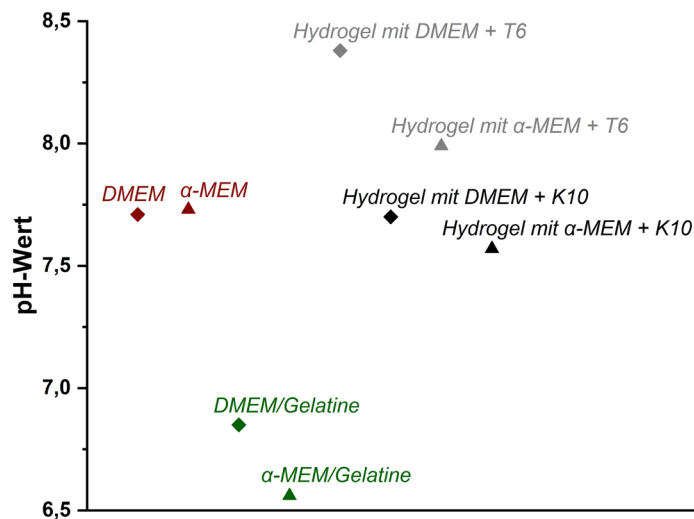


Abbildung 131: pH-Werte der Lösungen der Nährmedien in rot (DMEM und α -MEM), der Mischung aus DMEM/Gelatine und α -MEM/Gelatine in grün, dem Hydrogel mit TEOA 6 % mit beiden Nährmedien in grau und das Hydrogel mit K_2HPO_4 10 % mit beiden Nährmedien in schwarz ($n=1$).

Betrachtet man alle Ergebnisse des Vergleiches der Hydrogele mit α -MEM und DMEM zusammen, ist ein Austausch möglich. Die Hydrogele mit α -MEM als Nährmedium zeigen sogar leicht verbesserte Ergebnisse in Bezug auf die Hydrogel-Stabilität. Dies kann auf die insgesamt höhere Nährstoffkonzentration im DMEM zurückzuführen sein, die die Amin-Anhydrid-Konjugation negativ beeinflussen könnte. Das α -MEM im Gegensatz zum DMEM weniger potenziell störende Nährstoffe enthält, ist dieser Effekt hier weniger sichtbar.

4.7.3.2 Zellviabilitätsdaten

Die Zellviabilität mit α -MEM als Nährmedium und den mesenchymalen Stammzellen der Tränendrüse des Schweins wurden ebenfalls mit dem Gelatine-Hydrogel (Verhältnis 55:30:5 μ l) getestet. Als Base wurde Triethanolamin 6 % und als Oligomer oSMoMA-3,5 (30 % in DMSO) verwendet. Im Gegensatz zu den murinen embryonalen 3T3-Fibroblasten zeigt sich bei gleicher Inkubationszeit (1,5 Stunden) für die mesenchymalen Stammzellen eine deutlich niedrigere Absorption. Dies könnte auf die geringere metabolische Aktivität der mesenchymalen Stammzellen im Vergleich zu den 3T3-Fibroblasten zurückzuführen sein, die für die Reduktion von WST-8 erforderlich ist. Auch Paunescu *et al.* zeigten in ihrer Arbeit, dass mesenchymale Stammzellen eine geringere metabolische Aktivität aufweisen als in diesem Fall tumorassoziierte Fibroblasten [136]. Dennoch ist ein Anstieg der Zellviabilität von Tag 1 bis Tag 7 gut erkennbar. Vergleicht man die Zellviabilität von dem Hydrogel mit dem selbst synthetisierten Oligomer oSMoMA-3,5 mit dem Vergleichsgel (Rattenschwanz-Kollagen) zeigte sich, dass das Hydrogel mit oSMoMA-3,5 in der Hinsicht auf die Zellviabilität die besseren Ergebnisse liefert. Ein möglicher Grund könnte in den verbesserten physikalischen Eigenschaften des Hydrogels liegen. Die mechanische Festigkeit, die maßgeblich von der Quervernetzungsdichte abhängt, muss spezifisch an die Anwendung und den jeweiligen Zelltyp angepasst sein [137]. In diesem Fall könnten die physikalischen Eigenschaften des aus Gelatine und oSMoMA-3,5 hergestellten Hydrogels besser auf die Anforderungen der verwendeten Zellen abgestimmt sein. Darüber hinaus könnten die vorteilhaften Diffusionseigenschaften des Hydrogels eine effiziente Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff ermöglichen, die essenziell für ihr Überleben sind [138]. Insgesamt scheint dieses Hydrogel aufgrund der verbesserten Zellviabilität eine geeignetere Umgebung für diese Zellart zu bieten als das Vergleichsgel aus Rattenschwanz-Kollagen. Dies ist besonders beim Vergleich von Tag 7 erkennbar (Abbildung 132).

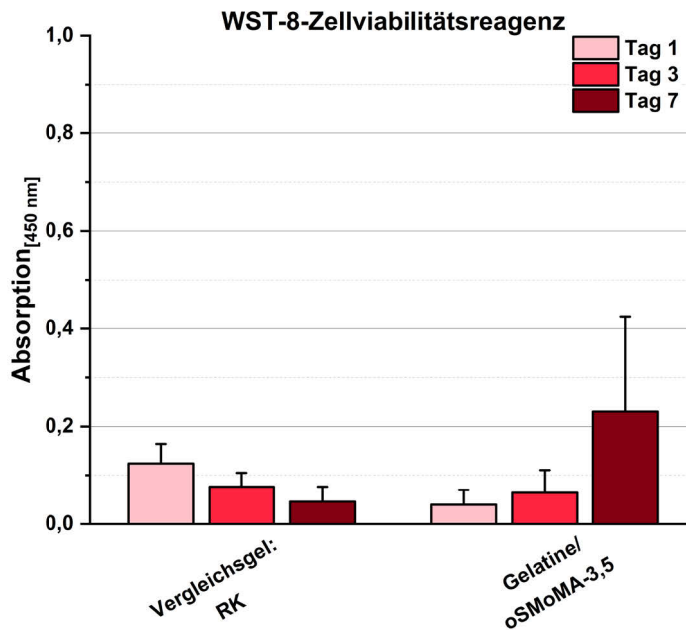


Abbildung 132: Zytokompatibilität der Gelatine-Hydrogele mit den murinen embryonalen 3T3-Fibroblasten über 7 Tage. Als Zellviabilitätsreagenz diente WST-8. Verglichen wurden das Vergleichsgel aus dem Rattenschwanz-Kollagen mit einem Hydrogel bestehend aus Gelatine, oSMoMA-3,5 in einer 30%igen Lösung, sowie TEOA 6 % als Base ($n=4$, $MW \pm SD$).

4.8 Zytotoxizität vom DMSO und Oligomer

Die Zytotoxizität des Lösungsmittels DMSO und des Oligomers wurde an den murinen embryonalen 3T3-Fibroblasten getestet, da sowohl das DMSO als auch das Oligomer während der Herstellung des Hydrogels mit den Zellen in Kontakt kommen. Für die Bestimmung der Anzahl an Zellen in jedem Mikrotiter, wurde eine Kalibriergerade mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,995 erstellt und genutzt (Abbildung 133). Als Zellviabilitätsreagenz wurde für alle Versuche WST-8 verwendet. Das Bild zeigt dabei den erhöhten Umsatz von WST-8 zu WST-8-Formazan durch stärkere Färbung von oben nach unten (orange) und damit die erhöhte Anwesenheit von lebenden Zellen.

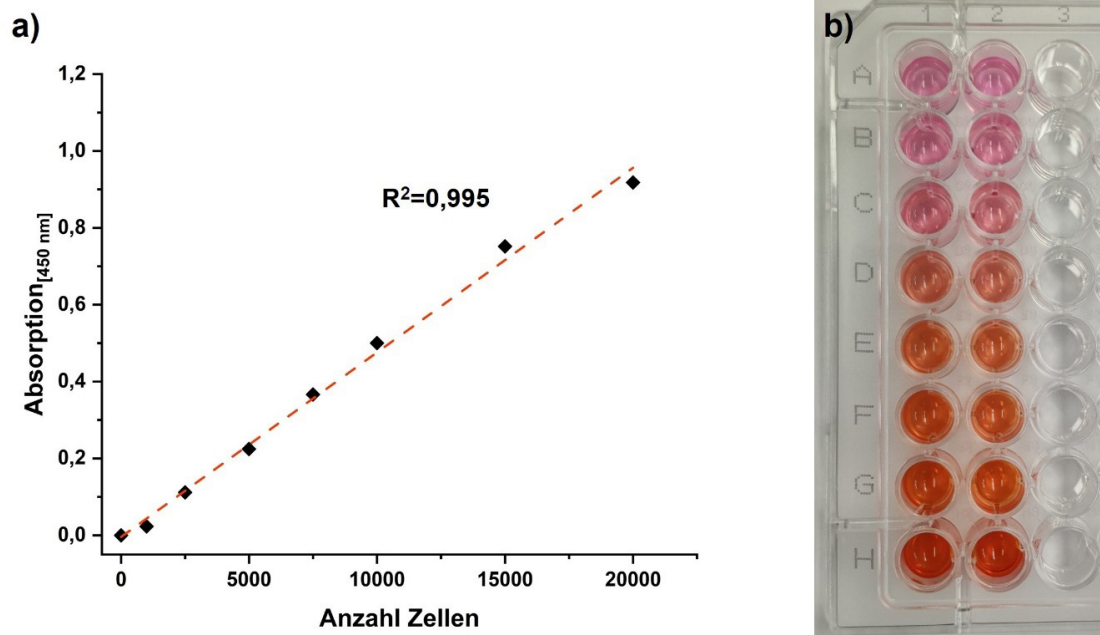


Abbildung 133: a) Kalibriergerade für die Bestimmung der Anzahl der Zellen über die Absorption bei 450 nm. Eine höhere Absorption spricht für einen höheren Anteil an lebenden Zellen ($n=2$, MW) und b) Aufnahme der Mikrotiterplatte mit zunehmender Färbung von oben nach unten durch zunehmende Anzahl an lebenden Zellen.

Abbildung 134 zeigt mikroskopische Aufnahmen bei der jeweiligen Anzahl an Zellen, die für einen Punkt in der Kalibriergeraden steht. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Anzahl an Zellen von 0 Zellen bis 50000 Zellen deutlich zunimmt. Auch hier ist die stärkere Färbung durch WST-8-Formazan zu erkennen.

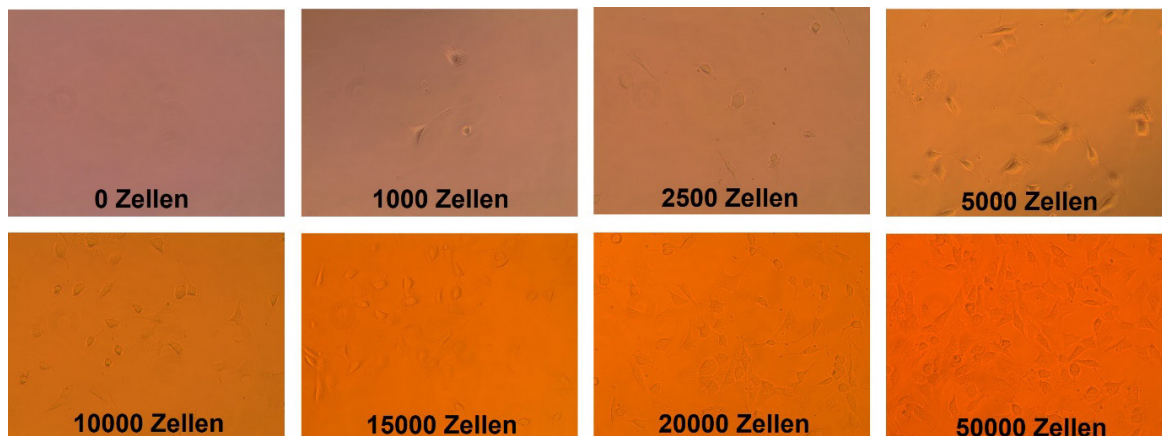


Abbildung 134: Mikroskopische Aufnahmen der Zellen in der Mikrotiterplatte am Durchlichtmikroskop. Die zunehmende Färbung mit steigender Anzahl an Zellen, kommt durch den erhöhten Umsatz von WST-8-Zellviabilitätsreagenz zu WST-8-Formazan.

In den Versuchen wurden verschiedene Konzentrationen an DMSO und verschiedenen Dissoziationsgrade des Oligomers getestet. Als Inkubationsdauer wurden für alle Versuchsreihen 20 und 60 Minuten gewählt. Die 20 Minuten stellen die Gelierungszeit für das Hydrogel nach der Herstellung dar und die 60 Minuten den Zeitpunkt des ersten Medium-Wechsels (DMEM), wobei DMSO und lösliche Hydrogel-Komponenten zu einem Großteil entfernt wurden. Im ersten Versuchsteil (Versuch 1, Abbildung 135) wurde reines DMSO mit 30 % Oligomer in DMSO und 30 % hydrolysiertem Oligomer in DMSO verglichen.

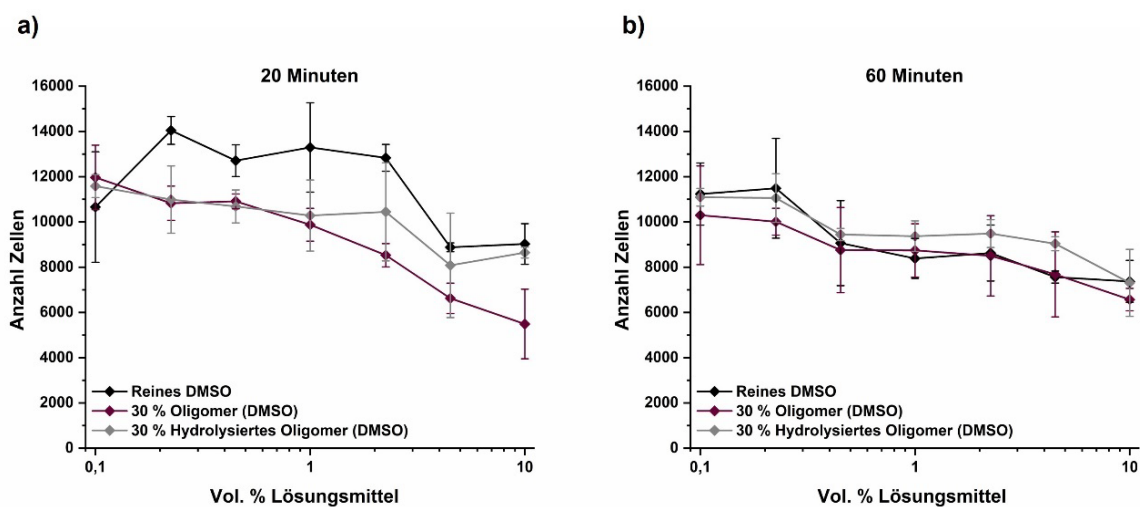


Abbildung 135: Bestimmung der Anzahl an Zellen nach Exposition mit reinem DMSO, 30%iger Oligomer-Lösung in DMSO und 30%iger hydrolysiertem Oligomer-Lösung in DMSO mit a) nach 20 Minuten und b) nach 60 Minuten (n=4, MW $\pm$ SD).

Betrachtet wurden dabei die Lösungsmittelmengen in Volumenprozent im verwendeten Nährmedium (DMEM). Da die Endkonzentration von DMSO in dem als Biotinte verwendeten Hydrogel 5,56 % beträgt, wurden die Werte um diesen Bereich gewählt. Vergleicht man die 20 Minuten und 60 Minuten Expositionszeit miteinander erkennt man, dass bei den 60 Minuten bereits ein Effekt ab 0,4 % Lösungsmittel und bei 20 Minuten erst ab 2,25 % erkennbar ist. Über die Zeit ist bei beiden Expositionszeiten ein abfallender Trend der Anzahl an Zellen sichtbar. Zudem scheint das Oligomer nicht-hydrolysiert und hydrolysiert nochmal einen kleinen zusätzlichen negativen Effekt zu zeigen. Vergleicht man die beiden Oligomere bei 20 Minuten miteinander, fällt auf, dass das hydrolysierte Oligomer im Vergleich zum nicht-hydrolysierten Oligomer weniger toxisch auf die Zellen wirkt. Ein Grund hierfür könnte sein, dass intakte Anhydride, die im nicht-

hydrolysiertem Oligomer enthalten sind, die Zellen ebenfalls durch eine Amin-Anhydrid-Konjugation acylieren können. Im zweiten Versuch (Versuch 2, Abbildung 137) wurde der Versuch 1 wiederholt, aber eine Ausgangskonzentration von 60 % des Oligomers verwendet und das hydrolysierte Oligomer an Stelle von DMSO in demineralisiertem Wasser gelöst. Betrachtet wurden auch hier die Lösungsmittelmengen in Volumenprozent. In Abbildung 136 werden die beiden Versuche mit reinem DMSO graphisch verglichen. Mit der gestrichelten Linie ist der erste Versuch (1) und mit der durchgezogenen Linie der zweite Versuch (2) dargestellt. Im Gegensatz zu dem Versuch 1 ist deutlich erkennbar, dass der Versuch 2 bereits mit einer deutlich niedrigeren Anzahl an Zellen gestartet wurde. Die Anzahl der Zellen, die bei einer Konzentration an Lösungsmittel von 0,1 % bis 10 % nicht überleben, ist im zweiten Versuch bei beiden Expositionszeiten deutlich erhöht. Das heißt die Zytotoxizität von DMSO für die Zellen war im zweiten Versuch (2) höher als im ersten Versuch (1). Direkte Vergleiche zwischen den beiden Versuchen sind deshalb erschwert.

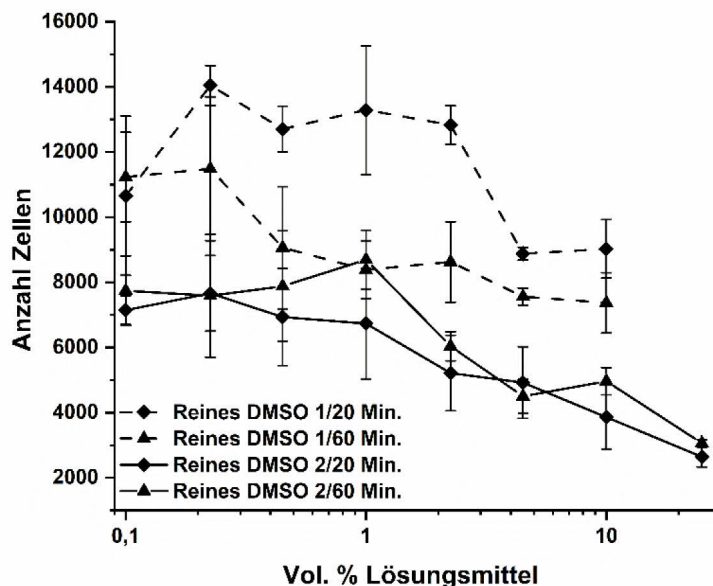


Abbildung 136: Bestimmung der Anzahl an Zellen nach Exposition mit unterschiedlichen Konzentrationen an reinem DMSO in Versuch 1 und Versuch 2. Verglichen wurden die Werte nach 20 und 60 Minuten ($n=4$, $MW \pm SD$).

Wie bereits erwähnt zeigt das DMSO in beiden Versuchen eine unterschiedlich starke Zytotoxizität auf die Zellen. Die Messung der In-vitro-Zytotoxizität, d. h. der Giftigkeit für eine Zelle, ist eine Methode zur Bewertung der Zell- und Gewebereaktion. Diese wird durch die Lyse der Zellen (Zelltod) oder durch die Hemmung der Zellproliferation bestimmt [139]. Um einen Extremfall abzudecken, wurde im zweiten Versuch (2) zusätzlich zu allen anderen Konzentrationen noch die Konzentration von 20 % DMSO hinzugefügt. Dort ist nochmal ein großer zusätzlicher zytotoxischer Effekt zu erkennen. Da die Versuche an unterschiedlichen Tagen und mit einer unterschiedlichen Passage der Zelllinie gestartet wurden, sind die Unterschiede der Zytotoxizität durch die unterschiedlichen Begebenheiten begründet. Betrachtet man Abbildung 137 zeigt sich, dass das hydrolysierte Oligomer in demineralisiertem Wasser erst bei 60 Minuten Expositionszeit einen negativen Effekt auf die Anzahl an Zellen zeigt. Bei 20 Minuten verringert sich die Anzahl über die Konzentrationen nicht. Bei 60 Minuten Expositionszeit ist über die Konzentrationen hinweg erneut ein kleiner negativer Trend des Oligomers (dieses Mal 60 %) zu erkennen. In diesem Versuch zeigen sich die negativen Einflüsse für beide Expositionszeiten schon bei einer Konzentration von 0,4 %.

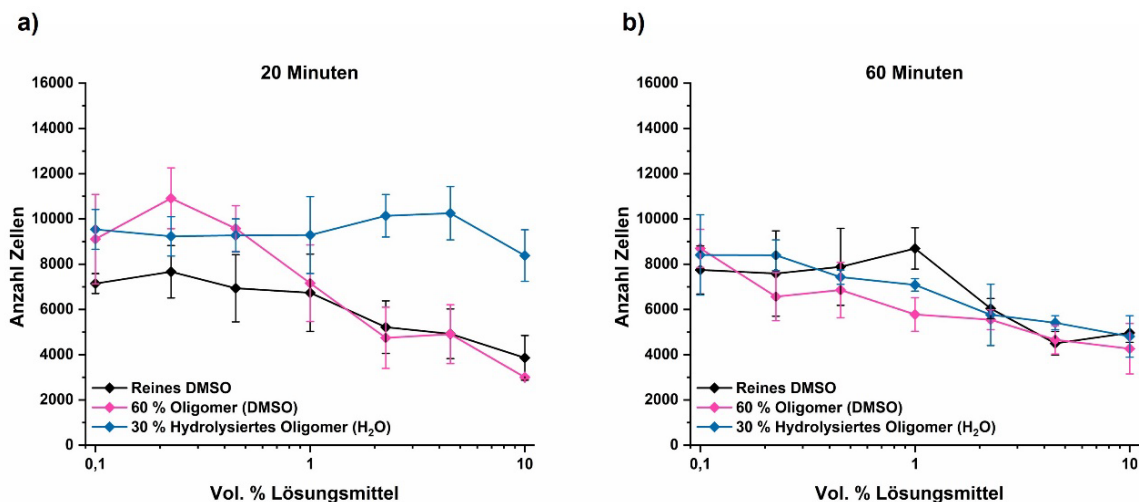


Abbildung 137: Bestimmung der Anzahl an Zellen nach Exposition mit reinem DMSO, 60%iger Oligomer-Lösung in DMSO und 30%iger hydrolysiertes Oligomer-Lösung in H₂O mit a) nach 20 Minuten und b) nach 60 Minuten (n=4, MW ± SD).

Zusätzlich wurden auch die pH-Werte der Lösungen mit reinem DMSO und 60 % Oligomer bestimmt (Abbildung 138). Durch alleinigen Zusatz von DMSO als Lösungsmittel blieb der pH-Wert nahezu unverändert und stieg nur minimal an. Beim Zusatz von 60 % Oligomer in DMSO jedoch zeigte sich ein deutliches Absinken des pH-Wertes mit steigender Konzentration an DMSO und Oligomer. Dies ist auch an der Änderung der Farbe der Lösung erkennbar. Die Farbe des Indikators Phenolrotes ändert sich von Kirschrot zu Hellgelb. Das bedeutet, dass mit steigender Oligomer-Konzentration der pH-Wert der Lösung sinkt. Beim Anhydrid, das im Oligomer enthalten ist, handelt es sich um ein Carbonsäure-Anhydrid. Durch geringe Mengen Wasser oder Restfeuchte kann das Anhydrid zu einer Säure hydrolysiert werden. Dies führt zu der beobachteten pH-Wert-Absenkung in der Lösung.

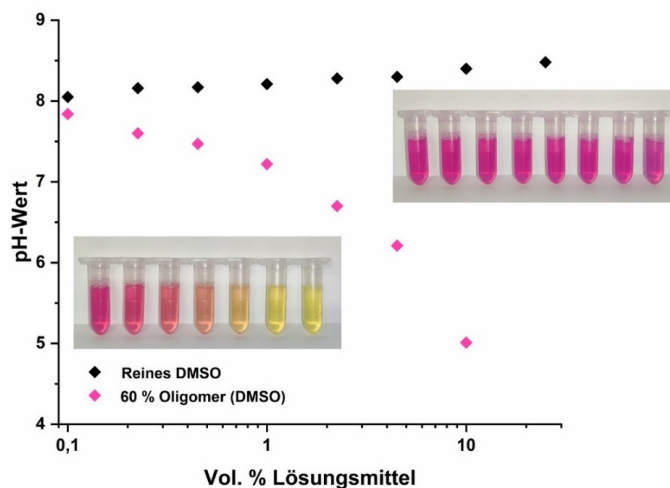


Abbildung 138: pH-Werte der Mischungen von DMEM mit reinem DMSO oder 60%iger Oligomer-Lösung in DMSO ($n=1$) plus dazugehörige Aufnahmen der gemessenen Lösungen im Eppendorf-Gefäß. Links sind die Lösungen mit 60%igem Oligomer und rechts mit reinem DMSO zu sehen.

In einem dritten Versuch (3) wurden nicht die Konzentrationen an Lösungsmittel, sondern die Konzentrationen an hydrolysiertem Oligomer in demineralisiertem Wasser bzw. an nicht-hydrolysiertem Oligomer in DMSO betrachtet und aufgetragen (Abbildung 139). Als Konzentration an demineralisiertem Wasser bzw. DMSO wurde in allen Kompositionen die Konzentration von 5,56 % beibehalten, da sie die Konzentration an DMSO in den beiden finalen Biotinten darstellt.

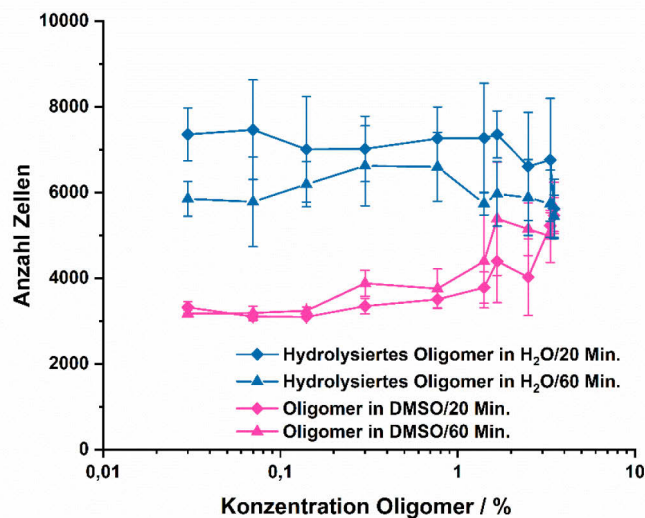


Abbildung 139: Bestimmung der Anzahl an Zellen nach Exposition mit hydrolysiertem Oligomer in H₂O (blau) und nicht-hydrolysiertem Oligomer in DMSO (pink) jeweils mit 30%igen Lösungen. Verglichen wurden 20 und 60 Minuten ($n=4$, $MW \pm SD$).

Betrachtet man die Anzahl an Zellen zu Beginn des Versuches, erkennt man bei der Zusammensetzung mit DMSO als Lösungsmittel schon eine deutlich niedrigere Anzahl an Zellen bedingt durch die hohe Konzentration von DMSO mit 5,56 %. Dennoch lässt sich durch diesen Graphen feststellen, dass die Erhöhung an Oligomer-Konzentration (hydrolysiert oder nicht-hydrolysiert) keinen zusätzlichen negativen Effekt aufweist. Zusätzlich dazu wurden die pH-Werte der Nährmedien mit Verunreinigung auch hier bestimmt und aufgetragen. Deutlich erkennbar ist ein abnehmender Trend des pH-Wertes mit erhöhter Konzentration an Oligomer bei gleichbleibender DMSO-Konzentration. Dafür spricht auch die Farbänderung der Lösung von Kirschrot bis Hellgelb durch den pH-Indikator Phenolrot, analog zu oben bei der Zugabe von 60%iger Oligomer-Lösung (Abbildung 140). Insgesamt hat das DMSO auch in niedriger Konzentration schon einen negativen Effekt auf die Anzahl an lebenden Zellen.

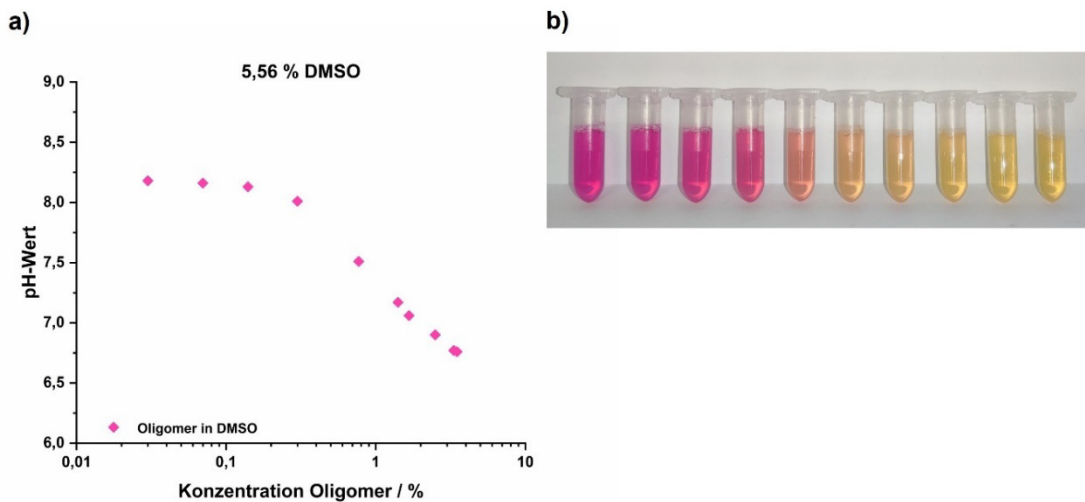


Abbildung 140: a) pH-Werte der Mischungen von DMEM mit 5,56 % DMSO und unterschiedlichen Oligomer-Konzentrationen ($n=1$) und b) Aufnahmen der Lösungen in Eppendorf-Gefäßen.

Wie Abbildung 136 zeigt, ergeben sich schon negative Effekte auf die Zellviabilität ab einer Konzentration von 0,4 %. Deutlichere Effekte sind ab einer Konzentration von mehr als 2,25 % zu beobachten und Konzentrationen um 10 % sollten nicht erreicht werden. Durch Versuch 3 konnte jedoch ausgeschlossen werden, dass das Oligomer in hydrolysierte oder nicht-hydrolysierte Form einen zusätzlichen negativen Effekt aufweist. Der Versuch zeigte aber, dass die Konzentration an DMSO so niedrig wie möglich gehalten werden sollte, um eine zu hohe Zytotoxizität zu vermeiden. In der Literatur werden unterschiedliche Maximalwerte für die DMSO-Zytotoxizität beschrieben. Schmidt *et al.* berichteten, dass eine Konzentration von 1,4 % im Zellkulturmedium keinen Einfluss auf die Zellen zeigte [140], während Chen und Thibeault herausstellten, dass 1 % DMSO schon einen negativen Einfluss auf Zellen zeigte und die maximale Konzentration 0,5 % betragen sollte [141]. Ein ähnlicher Versuch wurde in der Dissertation von Hafiz Awais Nawaz, durchgeführt, der insgesamt eine hohe Überlebenschance der Zellen bei kurzer Expositionsdauer feststellte. Bei längerer Expositionszeit führte jedoch schon eine Konzentration von mehr als 2 % zu einer geringeren Lebensfähigkeit der Zellen [30]. Insgesamt liegt die DMSO-Konzentration mit 5,56 % hier sehr hoch, wird aber wie bereits beschrieben durch die verschiedenen Waschschrte und Medienwechsel sehr schnell verdünnt und ausgewaschen.

4.9 3D-Druck

4.9.1 Vorversuch mit dem Imager[®]-Hydrogel

Der Vorversuch für den 3D-Druck mit dem Imager[®]-Hydrogel in Abbildung 141 zeigt, dass die Druckbarkeit bei der Hydrogel-Zusammensetzung, die gewählt worden ist, mit steigender Gelierungsdauer zunimmt. Startet man den Druck in diesem Fall vor der 17. Minute, kommt es zum Verlaufen und Überlappen der Stränge durch unzureichende Gelierung. Ab der 17. Minute jedoch war das Hydrogel mit den gewählten Einstellungen gut druckbar.

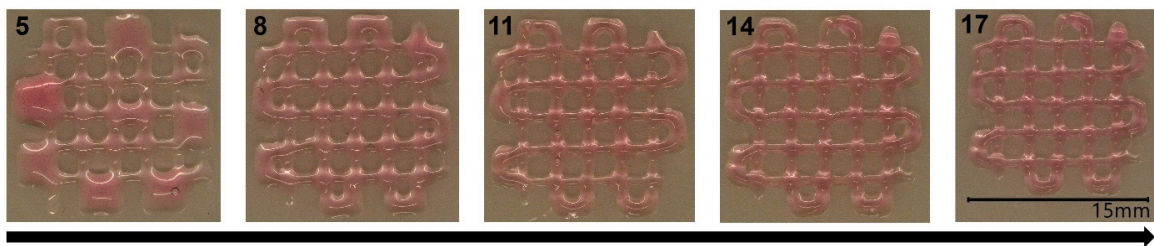


Abbildung 141: Mikroskopische Aufnahmen am Keyence Digitalmikroskop von den gedruckten Hydrogel-Konstrukten für die Vorversuche mit Imager[®]-Hydrogelen. Von links nach rechts steigt die Wartezeit bevor der 3D-Druck begonnen wurde.

Auch Krieghoff *et al.* [20] haben bereits eine Zweikomponenten-Hydrogelformulierung aus einem Premix (Imager[®] in Wasser und einer Base) und einer Oligomer-Lösung in DMF (oPNMA) aus einer einzigen Kartusche gedruckt. Bei den reaktiven Vormischungen müssen zwei wichtige Aspekte beachtet werden: Einerseits muss genügend Zeit vergehen, damit eine ausreichende Gelierung stattfinden kann, um die Stabilität der Druckform zu erreichen, andererseits muss das Zeitfenster getroffen werden, in dem die Formulierung druckbar bleibt [20]. Das bedeutet, dass das Druckfenster auch für das Imager[®]-Hydrogel dieser Arbeit erst nach einer gewissen Wartezeit gestartet werden konnte. Die Eigenschaft, die dieses Verhalten näher beschreibt, wird auch als Druckbarkeit bezeichnet. Gillispie *et al.* definierten die Druckbarkeit als „Die Fähigkeit eines Materials, unter bestimmten Druckbedingungen in einer Weise gedruckt zu werden, die zu einem für eine bestimmte Anwendung wünschenswertem Resultat führt“ [142]. Die Druckbarkeit kann über einen Wert (hier DI), der über den Innenumfang und Innenfläche einer Pore bestimmt wird, näher beschrieben werden.

In Abbildung 142 sind verschiedene Möglichkeiten für die Güte der Druckbarkeit dargestellt. Ein Wert von 1 bedeutet eine perfekte definierte Form, ein Wert von < 1 beschreibt kreisförmige Poren, typischerweise durch zu niedrige Viskosität der Biotinte und ein Wert von > 1 zeigt eine unregelmäßige Form, die durch Übergelierung verursacht wird [143].

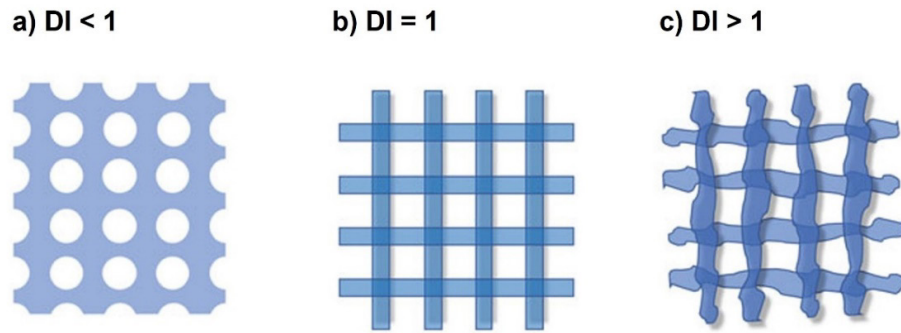


Abbildung 142: Güte der Druckbarkeit dargestellt über den Index DI mit a) nicht ausreichender Gelierung, b) gut definierten Linien und guter Druckbarkeit und mit c) zu stark geliertes Druckmaterial (modifiziert nach Crook et al. [143]).

Vergleicht man Abbildung 142 mit den gedruckten Konstrukten von Abbildung 141 lässt sich erkennen, dass man bis zur 11. Minute auf jeden Fall bei einem DI von unter 1 liegt. Ab der 17 Minute sieht es nach einer erfolgreich gedruckten Form aus, die einen DI von 1 und damit eine gute Druckbarkeit erreichen könnte. Aus diesem Grund muss das Druckfenster für jede neue Formulierung neu angepasst und untersucht werden. Beispielsweise konnte im Vergleich zu dieser Arbeit der Druck bei Krieghoff *et al.* bereits nach 12 Minuten gestartet werden [20]. Der Druckbeginn hängt somit immer von der Gelierzeit der Hydrogelformulierung ab. Aus diesem Grund sind Voruntersuchungen zu den Hydrogel-Eigenschaften vor Beginn der 3D-Druckversuche von großer Relevanz.

4.9.2 3D-Druck des Gelatine-Hydrogels als Biotinte

Für den 3D-Druck des Gelatine-Hydrogels als Biotinte wurde, wie in Kapitel 3.2.9.3 beschrieben worden ist, vorgegangen. Dafür wurden alle benötigten Utensilien zuvor sterilisiert oder desinfiziert und das Gelatine-Hydrogel im Verhältnis 55:30:5 (Gelatine + Base:Oligomer) vorbereitet. Die Zellen für den 3D-Druck wurden zuvor in der Gelatine-Lösung suspendiert. Es wurde, wie in Abbildung 143 dargestellt, gedruckt und die abgebildeten Hydrogel-Konstrukte erhalten (Abbildung 143b).

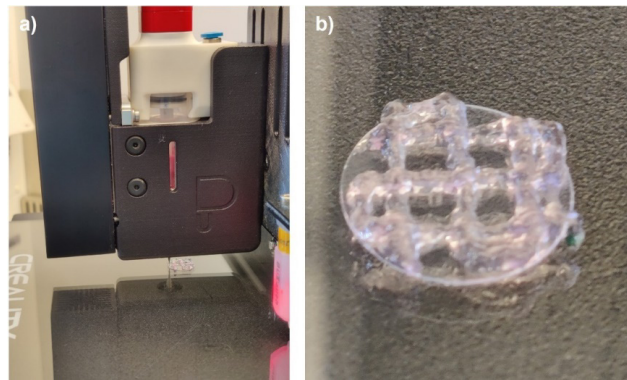


Abbildung 143: Aufnahmen a) des Druckkopfes eingebaut in die Temperiereinheit und während des Druckes eines Hydrogels und b) gedrucktes Hydrogel-Konstrukt auf einem 12 mm Deckglas.

Die nachfolgenden beiden Abbildungen sind am Digitalmikroskop aufgenommen worden und zeigen in Abbildung 144a, die Hydrogele, die mit 1, 2 oder 4 Druckschichten, mit beiden Biotinten und der 0,44 mm Kanüle (25 Gauge), gedruckt worden sind. Die Abbildung 144b zeigt das Gleiche mit der 0,16 mm Kanüle (34 Gauge). Der Durchmesser der Dosierkanüle stellt neben der Druckgeschwindigkeit, der Temperatur, der Druckzeit und dem Druck einen wichtigen Parameter beim Bioprinting dar. Ein höherer Durchmesser bei der Dosierkanüle reduziert zwar die Scherbelastung auf die Biotinte und damit die Gefahr die Zellen zu verletzen, erniedrigt aber die Druckgenauigkeit. Webb und Doyle testeten drei verschiedene Größen der Dosierkanülen mit 25 Gauge, 27 Gauge und 30 Gauge. Die besten Ergebnisse für die Druckbarkeit wurden dort mit der kleinsten Dosierkanüle (30 Gauge) erzielt. Der Einfluss auf die Zellviabilität wurde in der Studie aber nicht untersucht [144]. Allgemein wird gesagt, dass der Durchmesser der Dosierkanüle bei 0,15 mm und größer gehalten werden sollte [143], wie es hier der Fall ist. Bei beiden hier verwendeten Dosierkanülen ist ab der 4. Druckschicht eine sichtbare Auftrennung der Druckschichten schwierig,

wobei die verschiedenen Druckschichten ineinander übergehen. Dies kann, wie Abbildung 142 zeigt, auf eine Übergelierung des Hydrogels und einen DI von > 1 zurückzuführen sein. Da der Fokus aber auf dem 3D-Druck des Hydrogels mit eingebetteten Zellen lag, wurden die Konstrukte mit den 4 Druckschichten trotzdem für den Zelldruck genutzt.

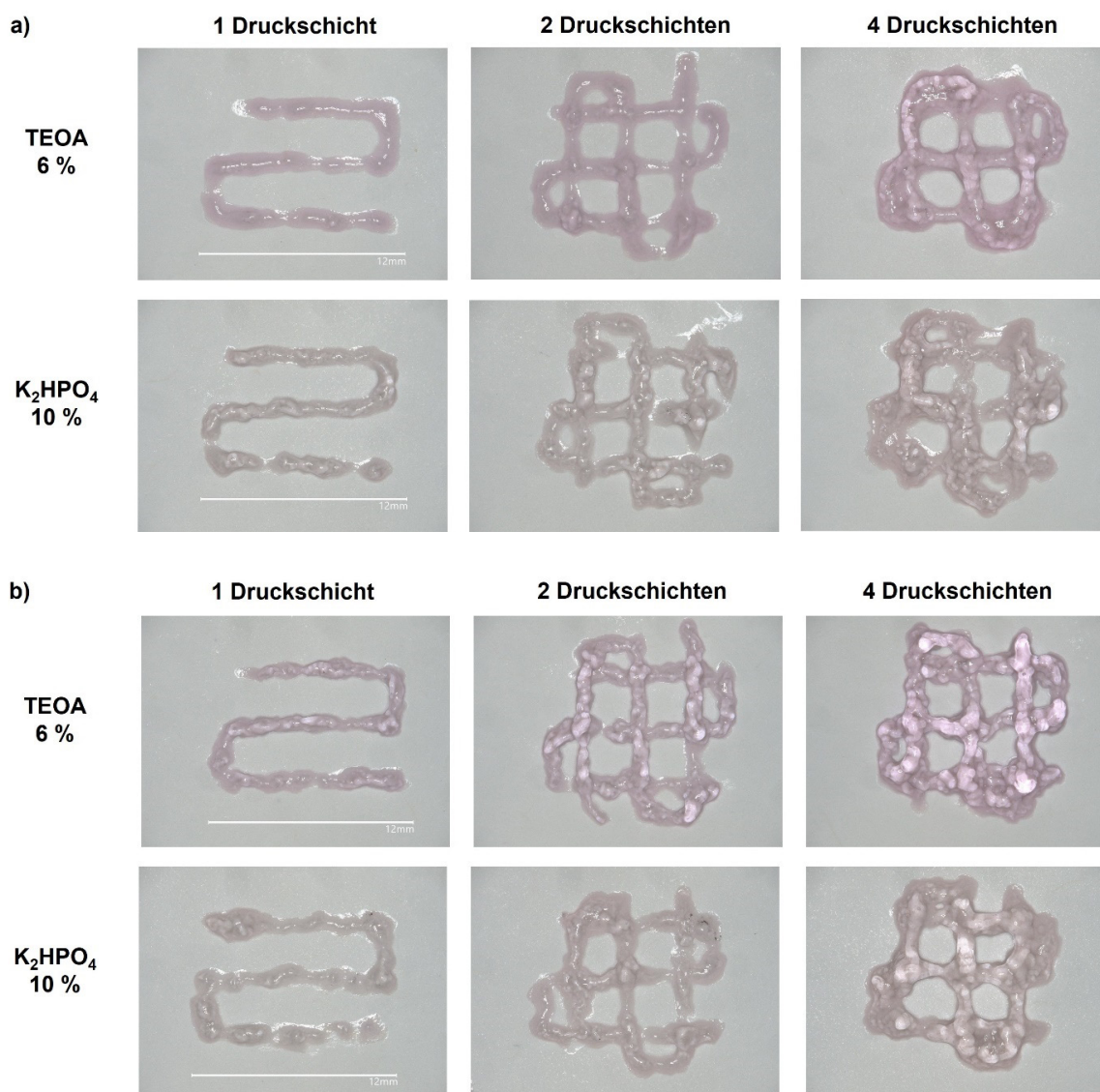


Abbildung 144: Mikroskopische Aufnahmen am Digitalmikroskop von gedruckten Gelatine-Hydrogelen als Biotinten mit beiden Basen (TEOA 6 % und K₂HPO₄ 10 %) und jeweils unterschiedlicher Anzahl an Druckschichten (1, 2 und 4). Unterschieden worden ist zwischen a) 0,44 mm und b) 0,16 mm Durchmesser der Dosierkanüle.

4.9.2.1 Massenschwankung

Der Versuch wurde durchgeführt, um die Massenschwankungen der gedruckten Hydrogel-Konstrukte zu beurteilen. Dafür wurden aus einer Kartusche je 10 Hydrogele gedruckt und die Masse danach gravimetrisch beurteilt, wie in Abbildung 145 gezeigt wird. Gedruckt und verglichen wurden dabei 2 und 4 Druckschichten mit den zwei verschiedenen Dosierkanülen (0,44 mm und 0,16 mm) und jeweils beiden Biotinten.

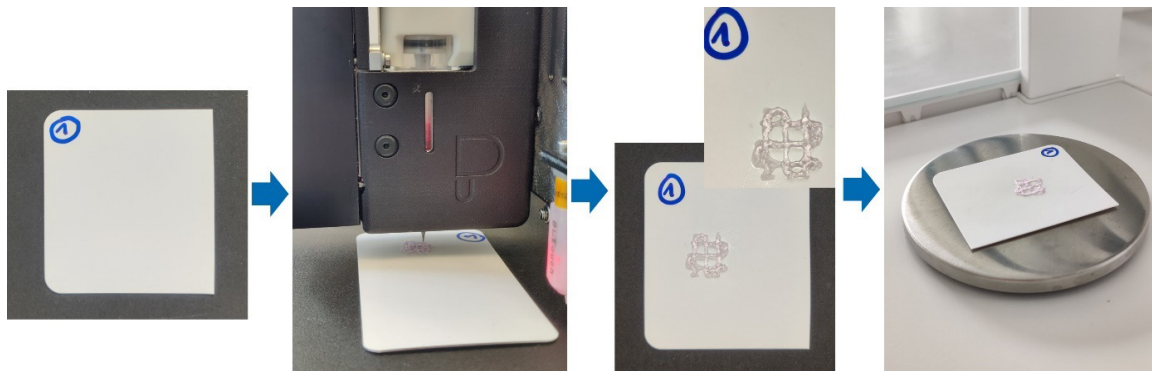


Abbildung 145: Aufnahmen zur zeitlichen Abfolge bei der Bestimmung der Massenschwankungen des Drucks der beiden Biotinten. Zuerst wird wie links dargestellt eine weiße Karte auf der Waage tariert und anschließend darauf ein Gelatine-Hydrogel mit 2 oder 4 Druckschichten gedruckt (Aufnahmen in dritter Spalte). Zuletzt wird die Masse des gedruckten Hydrogels, wie rechts dargestellt, ausgewogen.

Vergleicht man die beiden Graphen der Abbildung 146 miteinander, wird ersichtlich, dass die 2 Druckschichten im Gegensatz zu den 4 Druckschichten etwa die Hälfte an Gewicht ausmachen. Zudem ist erkennbar, dass die Massenschwankungen bei der 0,16 mm Kanüle etwas höher sind als die der 0,44 mm Kanüle. Eine Erklärung für die höhere Massenschwankung bei der 0,16 mm Kanüle könnte das Vorhandensein von Luftblasen im System sein, wie Abbildung 147 zeigt, welche bei geringerem Durchmesser der Kanüle prozentual mehr ins Gewicht fallen. Während der gesamten Zeit bleibt die Masse der gedruckten Form aber annähernd konstant, sodass man alle Hydrogele ohne einen Massenverlust über die Zeit verwenden konnte. Die homogenste Massenverteilung zeigen die Hydrogele mit der 0,44 mm Kanüle und den 2 Druckschichten mit beiden Biotinten. Die größten Unterschiede zeigen die beiden Biotinten bei den 4 Druckschichten, wo es wahrscheinlich auch zur Übergelierung kam. Die Biotinte mit K_2HPO_4 10 % führt bei den 4 Druckschichten verglichen zu TEOA 6 % zu Hydrogelen mit einer höheren Masse. Begründet ist dies durch die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Biotinten.

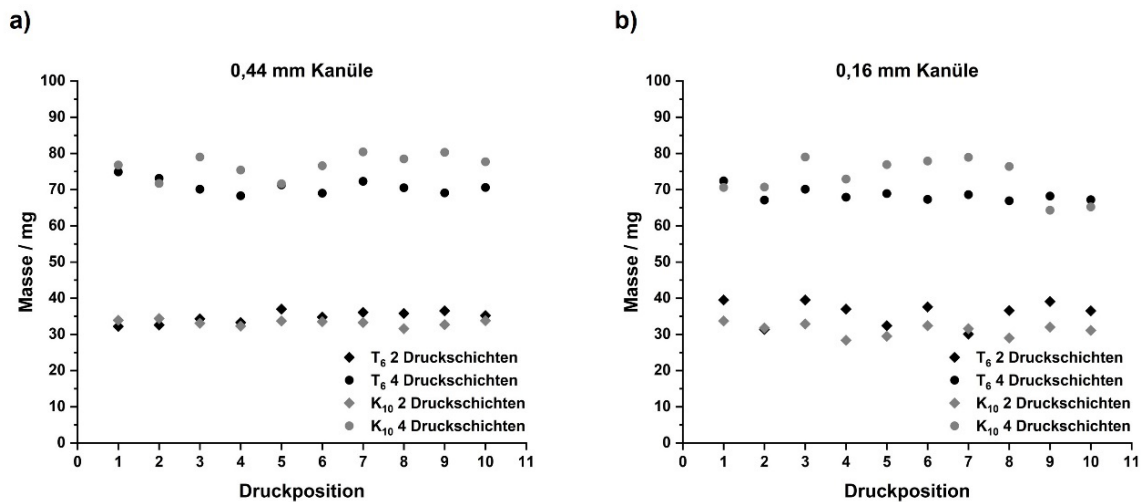


Abbildung 146: Massen der gedruckten Gelatine-Hydrogele mit 2 oder 4 Druckschichten für die jeweilige Druckposition. Unterschieden worden ist zwischen den Gelatine-Hydrogelen mit TEOA 6 % (schwarz) oder K_2HPO_4 10 % (grau) als Base. a) zeigt die Ergebnisse für die 0,44 mm Dosierkanüle und b) für die 0,16 mm Dosierkanüle ($n=1$).

Wie auch in Abbildung 147 erkennbar ist, neigte die Biotinte mit TEOA 6 %, im Vergleich zu der Biotinte mit K_2HPO_4 10 %, mehr zur Blasenbildung innerhalb des Hydrogels, sodass am Ende eine niedrigere Masse des gedruckten Hydrogels resultierte. Aufgrund der generell niedrigeren Masse bei den 2 Druckschichten, fällt dies erst bei den 4 Druckschichten ins Gewicht. Zudem könnten die vorhandenen Luftblasen zu Beginn noch, durch die niedrigere Viskosität, verdrängt werden, was bei höherer Viskosität im späteren Druckverlauf nicht mehr der Fall ist.

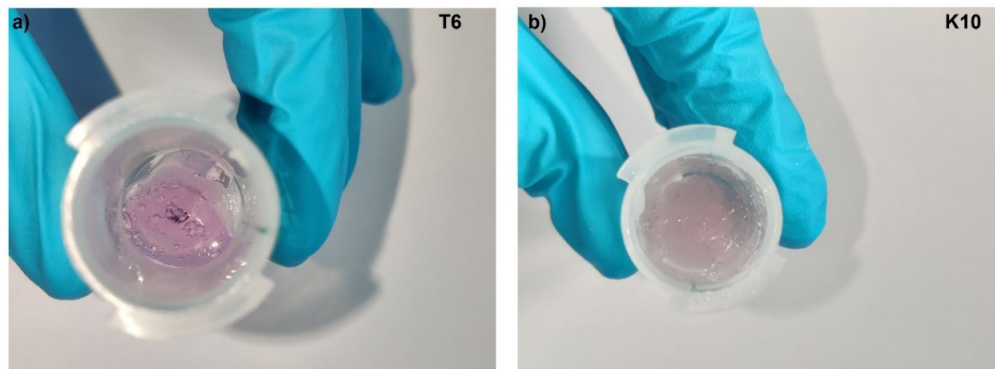


Abbildung 147: Aufnahmen der Biotinten in der Druckkartusche mit a) TEOA 6 % als Base und b) K_2HPO_4 10 % als Base.

4.9.2.2 Zellviabilität der gedruckten Hydrogel-Konstrukte

Die Zellviabilität der gedruckten Hydrogel-Konstrukte wurde an Tag 1, 3 und 7 nach dem 3D-Druck untersucht. WST-8 zeigt bei erhöhter Viabilität durch Bildung von WST-8-Formazan eine stärkere Färbung Richtung Orange, wie man es hier an Tag 7 sieht (Abbildung 148). Die Färbung der Lösungen in den Mikrotiterplatten nehmen von Tag 1 bis 7 zu, was für eine Proliferation der Zellen im gedruckten Hydrogel über die Zeit spricht. Zudem erkennt man, dass die gedruckten Stränge auch an Tag 1 und 3 schon leicht orange gefärbt sind. Dort war die Anzahl der Zellen nur noch zu gering, um die gesamte Lösung, wie es bei Tag 7 der Fall ist, zu färben. Als Beispiel sind die gedruckten Hydrogele aus der Biotinte mit K_2HPO_4 10 % dargestellt.

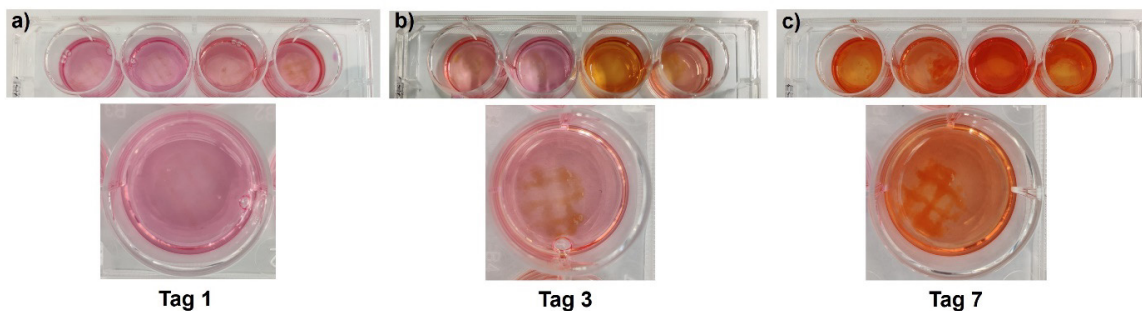


Abbildung 148: Aufnahmen der gedruckten Gelatine-Hydrogele (mit K_2HPO_4 10 % als Base) nach Überführung in eine 12-er Mikrotiterplatte und nach Kultivierung der Zellen in DMEM nach a) 1 Tag, b) 3 Tagen und c) 7 Tagen. Die untere Reihe zeigt die Nahaufnahmen der gedruckten Hydrogele mit eingebetteten murinen embryonalen 3T3-Fibroblasten. Stärkere Färbung zeigt einen stärkeren Umsatz des WST-8-Zellviabilitätsreagenz zu WST-8-Formazan und damit eine erhöhte Anzahl an lebenden Zellen.

Auch die Daten des WST-8-Assays (Abbildung 149) zeigen für beide Durchmesser an Dosierkanülen eine Steigerung der Zellviabilität von Tag 1 bis Tag 7, was für ein Wachstum der im Hydrogel eingebetteten 3T3-Zellen spricht. Spätestens ab Tag 3 ergibt sich eine erhöhte Zellviabilität für die Biotinte mit K_2HPO_4 10 % im Vergleich zu der mit TEOA 6 %. An Tag 7 gibt es für beide Biotinten eine deutliche Steigerung der Zellviabilität. Bei TEOA 6 % ist das aber nur bei der größeren Dosierkanüle mit 0,44 mm der Fall. Im Gegensatz dazu, kommt es bei der kleineren Dosierkanüle mit 0,16 mm nur zu einer weniger ausgeprägten Erhöhung der Zellviabilität. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass TEOA 6 % mit der großen Kanüle (0,44 mm) gedruckt werden sollte. Für K_2HPO_4 10 % zeigen beide Durchmesser der Dosierkanülen keine großen Unterschiede in Bezug auf die Zellviabilität.

Der gesamte Versuch bestätigt, dass beide Biotinten für die Einbettung von Zellen und den Zelldruck geeignet sind. Die erhöhte Zellviabilität an Tag 7 spricht zudem für eine erfolgreiche Proliferation der Zellen in den beiden Hydrogelen.

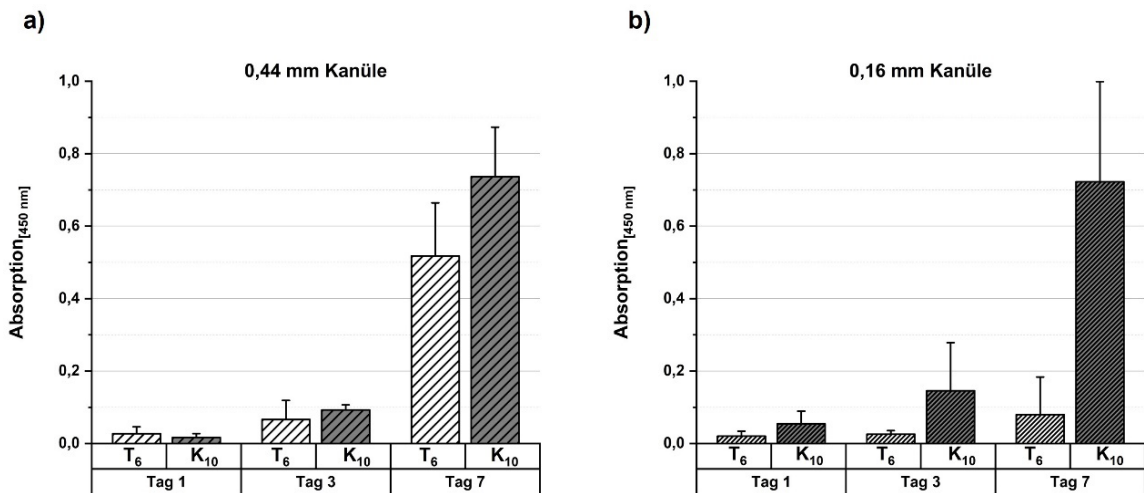


Abbildung 149: Zytokompatibilität der Gelatine-Hydrogele mit den murinen embryonalen 3T3-Fibroblasten und mit beiden Basen (TEOA 6 % und K_2HPO_4 10 %) über 7 Tage. Verglichen wurde a) die 0,44 mm Dosierkanüle mit b) der 0,16 mm Dosierkanüle ($n=4$, $MW \pm SD$).

4.9.2.3 Mikroskopische Untersuchung der Hydrogel-Konstrukte

Am Beispiel der Biotinte mit K_2HPO_4 10 % wurden auch Bilder am Durchlichtmikroskop aufgenommen, an dem die Zellen visuell dargestellt werden konnten (Abbildung 150). Dabei wurden beide Kanülen miteinander verglichen. Die stärkere Zunahme der orangenen Farbe basiert auf der Zunahme der Umsetzung des WST-8-Zellviabilitätsreagenz aufgrund von erhöhtem Vorhandensein an lebenden Zellen. Bei beiden Durchmessern der Kanülen ist hier auch eine deutliche Zunahme der Zellanzahl im Hydrogel über 7 Tage sichtbar. An Tag 1 sind noch deutliche Freiräume und nur vereinzelte Zellen erkennbar, an Tag 7 hingegen ist nahezu jeder Freiraum durch Zellen übernommen worden. Sichtbar wird das auch nochmal bei der 40-fachen Vergrößerung der Proben von Tag 7. Isolierte Fibroblasten haben die charakteristische längliche, dreieckige und abgeflachte Form mit einem konvexen und unregelmäßigen Umriss. Zudem sind sie adhäriert an der Unterfläche und nehmen den Kontakt zu Nachbarzellen auf, wodurch sich ihre Form verzerrt. Die Fibroblasten bilden so das charakteristische Geflecht aus vielen Zellen. Fibroblasten, die die Adhäsion zum Untergrund oder zu anderen Zellen verlieren zeigen dagegen eine kugelförmige Form [145].

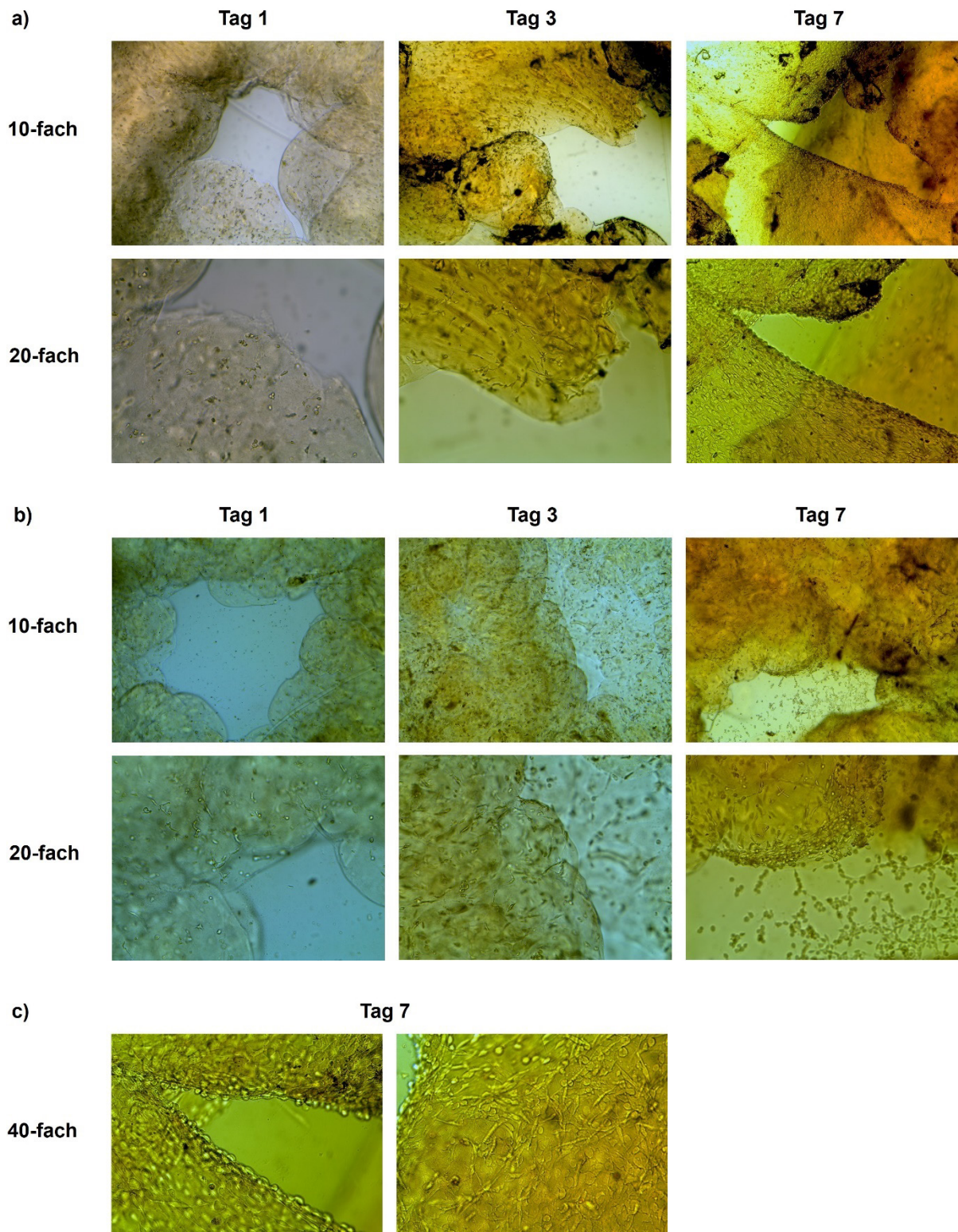


Abbildung 150: Mikroskopische Aufnahmen am Durchlichtmikroskop von den 3T3-Zellen in den gedruckten Gelatine-Hydrogelen mit K_2HPO_4 10 % als Base und über 7 Tage (Tag 1, Tag 3 und Tag 7). Unterschieden worden ist zwischen a) 0,44 mm Dosierkanüle mit 10-facher und 20-facher Vergrößerung, b) 0,16 mm Dosierkanüle mit 10-facher und 20-facher Vergrößerung und c) 0,16 mm Dosierkanüle an Tag 7 mit 40-facher Vergrößerung. Die angegebene Vergrößerung (10-fach/20-fach/40-fach) entspricht der Objektivvergrößerung des eingesetzten Durchlichtmikroskops.

Wie in Abbildung 150 dargestellt, zeigen die in das Hydrogel eingebetteten Fibroblasten eine gespreizte und adhäsive Form, so dass eine Wechselwirkung mit dem Hydrogel und auch eine Kontaktaufnahme mit anderen Zellen stattfindet, was wiederum auf eine gute Zellviabilität hinweist. An Tag 7 (0,16 mm Kanüle) erkennt man zudem, dass erste Zellen aus dem Hydrogel auswandern und sich außerhalb des Gels angesiedelt und dort vermehrt haben.

4.9.3 Zweikomponentendruck

Der Zweikomponentendruck bietet vielversprechende Möglichkeiten, ist jedoch mit verschiedenen Herausforderungen verbunden. Eine wesentliche Schwierigkeit ist die Sicherstellung einer ausreichenden Durchmischung bzw. Gelierung der beiden Komponenten während des Druckprozesses zur Erzielung homogener Ergebnisse. Ebenso essenziell ist die genaue Abstimmung der beiden Druckköpfe miteinander, um das richtige Mischverhältnis für eine optimale Gelierung einzuhalten. Zudem ist die Stabilität der gedruckten Konstruktion nach Abschluss des Druckprozesses entscheidend, um sowohl die strukturelle Integrität als auch die gewünschte Funktionalität zu gewährleisten. Diese Aspekte machen eine gezielte Optimierung der Prozessparameter und Materialeigenschaften erforderlich, um den Zweikomponentendruck optimal nutzen zu können. Im ersten Teil des Versuches, wurde die Masse an demineralisiertem Wasser bestimmt, die jeweils aus einem Druckkopf in eine Petrischale dosiert werden konnte. Dabei handelte es sich um zwei identische Druckköpfe, bei denen nur das Verhältnis von 85:5 bzw. 17:1 (Gelatine + Base:Oligomer) zueinander in Anlehnung an die Entwicklung der Biotinte gewählt und manuell über den unten gezeigten G-Code eingestellt worden ist (Abbildung 151). Dieser wurde als Start-G-Code zu den Befehlen hinzugefügt. Der rote Kasten zeigt das Verhältnis von 17:1 an.

```
M163 S0 P17
M163 S1 P1
M164 S2
T2
```

Abbildung 151: G-Code für die manuelle Eingabe der Steuerung der beiden Druckköpfe gemeinsam (Verhältnis 17:1).

Abbildung 152 zeigt visuell die Mengenverhältnisse, die mit demineralisiertem Wasser in beide Petrischalen dosiert worden sind. Der Graph auf der rechten Seite zeigt die gemessenen Masseergebnisse als Verhältnis für die 4 Durchläufe.

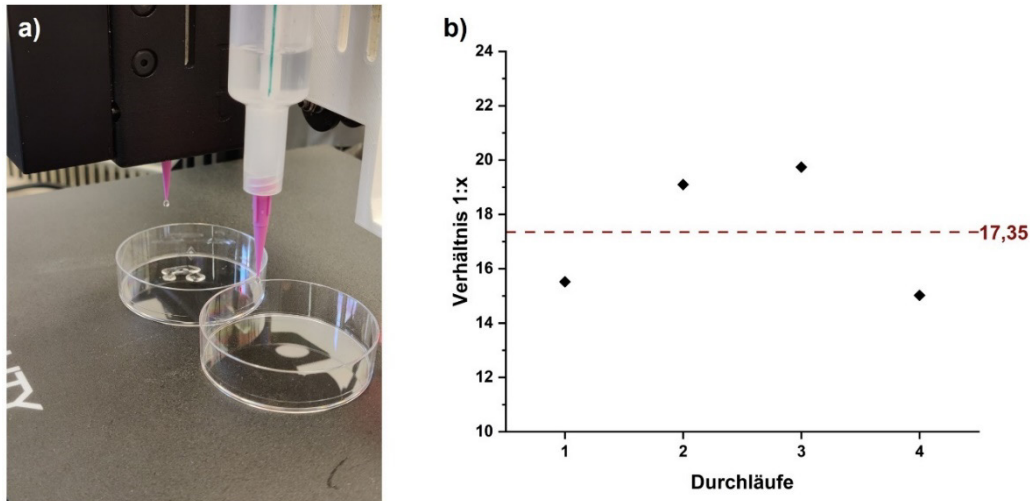


Abbildung 152: a) Aufnahme des Drucks der zwei Druckköpfe in zwei Petrischalen parallel zueinander und b) ausgewogene Verhältnis der demineralisierten Wassermengen in den zwei Petrischalen.
Sollwert = 17 (4 Durchläufe mit jeweils $n=1$).

Der Mittelwert von den 4 Durchläufen ist hier mit der gestrichelten Linie dargestellt und liegt bei 17,35. Dieser Wert ist nah an der gewünschten Zahl von 17. Aus diesem Grund kann gesagt werden, dass die Befehlsgrundlage erfolgreich war und die entsprechenden Befehle vom Drucker so umgesetzt werden konnten. Im zweiten Teil des Experiments wurde zum ersten Mal versucht, mit beiden Druckköpfen parallel über die selbst konstruierte Y-Verbindung zu drucken. Um beide Druckköpfe miteinander zu verbinden, musste zuerst die Halterung gedruckt werden, die beide Druckköpfe in speziellem Winkel zueinander halten konnte. Anschließend wurde das Y-Verbindungsstück entworfen, in dem es zu der Vermischung der beiden Komponenten miteinander kommen sollte. Die Bilder in Abbildung 153 zeigen in zeitlicher Reihenfolge den Inhalt des Y-Verbindungsstücks, bei dem aus der horizontalen Kartusche Oligomer und Base zusammenkommen und aus dem schrägen Teil die Oligomer-Lösung. Bei der pinken Lösung handelt es sich um die Gelatine-Lösung zusammen mit der Basen-Lösung und bei der gelben Flüssigkeit um die Oligomer-Lösung. Es wird deutlich, dass keine erfolgreiche Durchmischung der Komponenten stattfindet und ein Teil des inhomogenen gelierenden Hydrogels in dem Y-Verbindungsstück präzipitiert.

Das Präzipitat wurde durch den zu hohen Druck, der sich im Y-Verbindungsstück aufgebaut hat, sogar zurück in einen Druckkopf hochgedrückt. Zu keinem Zeitpunkt konnte das Hydrogel durch die Dosierkanüle in die Petrischale gedruckt werden. Die Idee hinter dem Zweikomponentendruck war die Dauer zu reduzieren, in dem die Zellen mit dem DMSO als Lösungsmittel für das Oligomer in Kontakt kommen. Eine Mischung der Komponenten unmittelbar vor der Extrusion sollte die Zytotoxizität des DMSOs auf die Zellen in der Gelatine-Lösung verringern. Zudem könnte so auf die Mischung der Komponenten vor der Befüllung am Vortex-Mischer verzichtet und so die zusätzliche Scherung auf die Zellen verringert werden. Während des Extrusionsprozesses des Bioprintings wirken verschiedene mechanische Kräfte auf die Zellen. Einen großen Effekt hat dabei die Scherbeanspruchung während des 3D-Druckes, die als Hauptursache für die Schädigung bzw. den Tod von den Zellen gilt [146]. Bei dem 3D-Druck des Hydrogels aus einer Komponente gab es durch die notwendige vorherige Mischung am Vortex-Mischer einen zusätzlichen Schritt mit hoher Scherbelastung. Auf diesen Schritt könnte verzichtet werden, wenn der Mischprozess in den 3D-Druckprozess inkludiert werden könnte. Einen zusätzlichen Vorteil bietet die niedrige Viskosität der Einzel-Lösungen, die sich erst durch Kombination der Komponenten erhöht. Eine zu hohe Viskosität in der Zellumgebung kann durch zu hohe Scherbelastung die Zellviabilität beeinflussen [32].

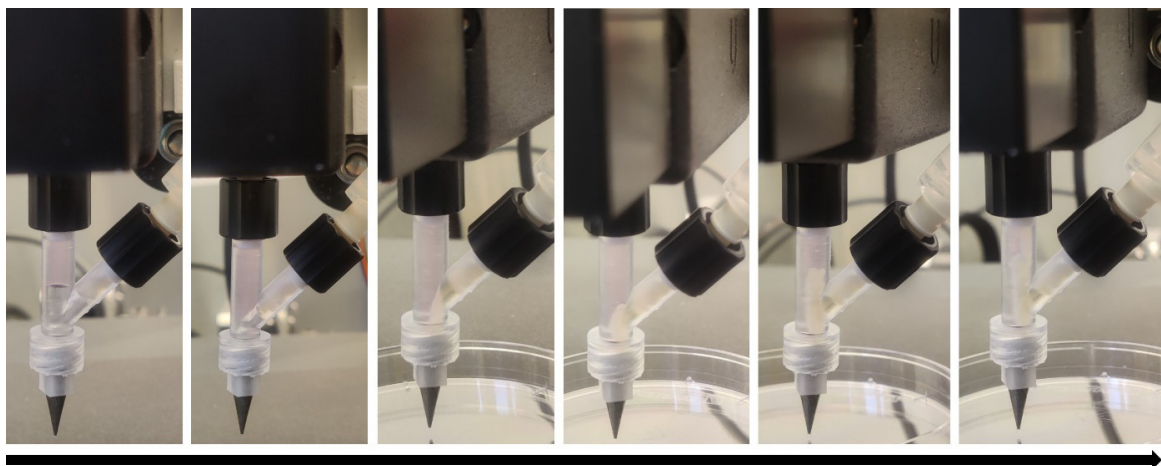


Abbildung 153: Aufnahmen des mit Gelatine-Hydrogel gefüllten Y-Verbindungsstücks in aufsteigender zeitlicher Reihenfolge.

Andere bisher bekannte Ansätze um zwei Komponenten in einem kontinuierlichem Druckprozess miteinander zu verbinden, beschäftigten sich bisher mit anderen Techniken. Piras und Smith verdruckten ihre Natrium-Alginat-Biotinte, in Kombination mit verschiedenen anderen Polysacchariden, in ein Quervernetzer-Bad, in dem sich Calcium-Ionen befanden. Alginat bildet in Anwesenheit von mehrwertigen Kationen leicht gelierbare Hydrogele und wird sehr oft als Biotinte verwendet. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Konzentrationen der beiden Komponenten unabhängig voneinander eingestellt werden konnte [147]. Eine andere Möglichkeit ist der Druck über eine koaxiale Düse. Die koaxiale Extrusion kann als Abscheidung von konzentrischen Ringen von zwei oder mehr Strömen definiert werden, was durch die Verwendung der koaxialen Düse erreicht wird [148]. Shao *et al.* druckten damit feine Nährstoffzufuhrkanäle in zellbeladene Konstrukte. Das Ergebnis mit dem Druck der koaxialen Düse waren großflächig gedruckte Gewebe mit Mantel-Kern-Fasern. Dafür wurden für den Mantel GelMA, ein Gelatine-Derivat mit gut regulierbaren physikochemischen Eigenschaften, und für den Kern reine Gelatine als Biotinten verwendet. Im anschließenden Kultivierungsprozess löste sich die reine Gelatine auf, sodass das gewünschte Hohlnetzwerk entstand [149]. Von Feng *et al.* wurde eine Strategie entwickelt, um heterogene Konstrukte mit Hilfe eines mikrofluidischen Druckkopfes zu drucken. Dabei konnten verschiedene Biotinten durch die drei Einlässe an den Druckkopf angeschlossen werden, die gemeinsam durch einen Auslass extrudiert werden. Durch die Anpassung der verschiedenen Flussratenverhältnisse konnte die Zusammensetzung der Konstrukte individuell angepasst werden [150]. Pagan *et al.* kombinierten diese Technik in einem eigenen entwickelten Drucker sogar noch mit einem lichtemittierenden Fach für photovernetzbar Biotinten [151]. Um ebenfalls mehrere Vorbereitungsschritte vor dem eigentlichen 3D-Druck zu sparen, wurde von Bhattacharyya *et al.* ein halbautomatisierter Zweischnellenextruderkopf entwickelt, der das Mischen und Extrudieren synchron ausführt. Dabei handelte es sich um einen Druckkopf mit Doppeleinlass, bei dem die Zellen erst später zugeführt wurden, um die hohe Belastungszeit und damit Schäden der Zellen zu verhindern. Dafür verwendet wurden das Alginat-Hydrogel, α -Tricalciumphosphat Mikro-/Nanopartikel und Osteoblasten-Zellen [152]. Zhou *et al.* entwickelten eine von Spinnen inspirierte 3D-Drucktechnik

für die in situ-Gelierung aus mehreren Zylindern, die auf der Annahme basiert, dass Spinnen mit ihren 7 Spinndüsen auch 7 verschiedene Proteine absondern können. Dafür wurde eine 7-Kanal-Kapillare genutzt, wobei jede einzeln befüllt wurde. Die Tinten liefen anschließend zusammen und endeten an einer gemeinsamen Druckdüse [153]. Die Methode mit der größten Ähnlichkeit zu der oben entwickelten Methode stellt jedoch die Dual-Spritzen-Technik mit einem statischen Mischer von Puertas-Bartolome *et al.* dar. Verwendet wurden dabei Carboxymethylchitosan und teiloxydierte Hyaluronsäure als Biotinten. Der Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit zwei niedrig viskose Lösungen zu verwenden, die durch die in-situ-Gelierung für die strukturelle Integrität sorgen [32]. Vergleicht man alle genannten Methoden mit der hier entwickelten Methode lässt sich feststellen, dass es bisher keine Methode gab, die es ermöglichte, zwei unabhängig voneinander steuerbare Druckköpfe über ein selbst entworfenes Y-Verbindungsstück miteinander zu verbinden. Zusätzlich konnte einer der beiden Druckköpfe mit einer Temperiereinheit bei 37 °C gehalten werden. Allerdings ist bisher nur gelungen, ein bestimmtes extrudierbares Verhältnis zueinander einzustellen und die beiden entwickelten Biotinten mit Zellen beladen in einer Einzelkartusche zu verdrucken. Um den Druck als Zweikomponentendruck zu ermöglichen, müssen weitere Verbesserungen erreicht werden.

4.9.3.1 Verbesserungsansätze

Um den Zweikomponentendruck des Gelatine-Hydrogels aus zwei Kartuschen zukünftig zu ermöglichen, erscheinen Anpassungen an dem selbst entworfene und gedruckten Zubehör vielversprechend. Vom Winkel und dem Abstand der beiden Druckköpfe zueinander erfüllt die gedruckte Halterung die Anforderungen. Bisher müssen die Druckköpfe in der Höhe jedoch manuell und getrennt zueinander eingestellt werden. Eine Verbesserung wäre die Höhe und Winkel der Druckköpfe zueinander automatisiert anpassen zu können. Das Y-Verbindungsstück passt von der Form und dem Winkel ebenfalls gut zu den beiden Druckköpfen. Jedoch war der Druck im System zu hoch, sodass das gelierte Hydrogel nicht durch die Dosierkanüle heraus, sondern in den horizontalen Druckkopf hochgedrückt wurde. Zudem war, neben der ungenügenden Mischung, die Verweildauer im Y-Verbindungsstück zu lange für das Hydrogel, sodass es dort

zu Präzipitation kam. Die Möglichkeiten zur Verbesserung dieser Probleme sind die Anpassung der Biotinte in der Gelierungszeit oder die Anpassung des Y-Verbindungsstückes. Diese kann zum Beispiel einen niedrigeren Durchmesser oder eine zusätzliche Mischtechnik, wie ein statisches Mischelement, beinhalten (Abbildung 154).

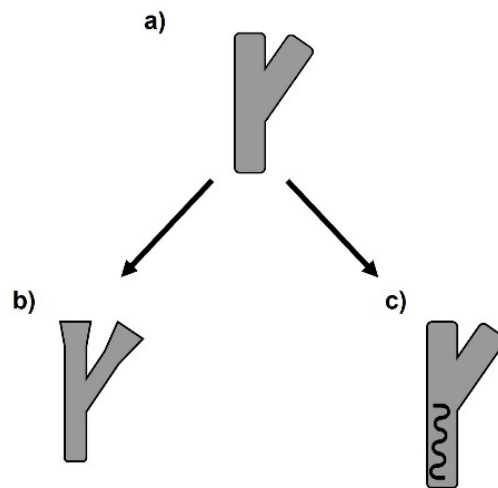


Abbildung 154: Verbesserungsansätze für das Y-Verbindungsstück mit a) Ursprungsvariante, b) Verengung des Durchmessers und c) Einbau einer zusätzlichen Mischtechnik.

5 Zusammenfassung

„Tissue Engineering“, ein wichtiger Bereich der Regenerativen Medizin, hat zunehmend an Bedeutung gewonnen, um fehlendes Gewebe entweder strukturell oder funktionell ersetzen zu können. Für die Herstellung von neuem Gewebe sind zwei zentrale Komponenten erforderlich: ein biokompatibles Material, das in dieser Arbeit in Form eines Zweikomponenten-Hydrogels entwickelt wurde, und die eingebetteten Zellen. Beide Komponenten zusammen dienen als Basis für die Entwicklung einer Biotinte, die im Rahmen dieser Arbeit konzipiert werden sollte. Bei der Entwicklung des Zweikomponenten-Hydrogels lag der Fokus auf der Amin-Anhydrid-Konjugation als Quervernetzungsreaktion von synthetischen (oSMoMA-x) und natürlichen Polymeren (Chitosan, Gelatine und Imagel®). Das entwickelte und charakterisierte Biomaterial wurde anschließend als Biotinte via 3D-Druck in ein bestimmtes Gerüst (Scaffold) gebracht. Die Eignung der entwickelten Biotinte für den 3D-Druck als auch die Zellviabilität der gedruckten Konstrukte konnte abschließend erfolgreich nachgewiesen werden.

Zur Reduzierung der Zytotoxizität des Oligomers und zur Verbesserung seiner Zytokompatibilität wurde eine neue Generation von Oligomeren unter der Bezeichnung oSMoMA-x entwickelt. Dafür wurde, neben Stearylacrylat (SA) als hydrophober Grundbaustein und Maleinsäureanhydrid (MA) als funktioneller Bestandteil für die Quervernetzung, Acryloylmorpholin (AMo) als hydrophiles Comonomer ergänzt. Durch die gezielte Veränderung der Comonomerzusammensetzung während des Syntheseprozesses konnten Oligomere mit unterschiedlichen Anhydrid-Gehalten und spezifischen Eigenschaften hergestellt werden. Dies führte zur Entwicklung einer Reihe von Oligomeren, von oSMoMA-2 bis oSMoMA-10, die sich insbesondere in der Zusammensetzung der Comonomere Maleinsäureanhydrid (MA) und Acryloylmorpholin (AMo) voneinander unterschieden. Die verschiedenen Oligomere konnten erfolgreich mit dem ^1H -NMR, der GPC und den Titrationen (konduktometrische Titration und Brown-Fujimori-Titration) charakterisiert werden. Das zahlenmittlere Molekulargewicht der Oligomere lag im Bereich von 1500 bis 3500 g/mol, während die Intaktheit der Anhydrid-Gruppen (MA) zwischen 75 % und 100 % variierte.

Zudem zeigte das Verhältnis von Acryloylmorpholin (AMo) zu MA, wie erwartet, einen Anstieg mit zunehmendem MA-Gehalt im Oligomer, was sich entlang der Reihe von oSMoMA-2 bis oSMoMA-10 bestätigte.

Durch die Vielseitigkeit der synthetisierten Oligomere und durch die Verwendung von drei verschiedenen natürlichen Biopolymeren (Chitosan, Gelatine und Imagel®) wurde eine Reihe an Hydrogelen mit unterschiedlichen Eigenschaften hergestellt, die anschließend vergleichend rheologisch und physikochemisch charakterisiert wurden. Die Charakterisierungen umfassten die Analyse der Gelierungskinetik, insbesondere durch die Messung des Speichermoduls (G'), die Durchführung eines Frequenztests an vorfabrizierten Hydrogel-Platten, sowie die Bestimmung des Trockengewichts, der herauslösbaren Anteile und des Wassergehalts. Der Quervernetzungsgrad wurde in einigen Fällen mittels TNBS-Assay ermittelt. Zudem wurde die Herstellung des Hydrogels durch den Einsatz einer elektronischen Pipette optimiert, um eine gleichmäßigere Durchmischung der Komponenten zu gewährleisten. Jedes natürliche Biopolymer wies spezifische charakteristische Eigenschaften auf, die sich auf die Herstellung des Hydrogels auswirkten. Dennoch konnte für jedes natürliche Biopolymer eine optimale Zusammensetzung des Hydrogels ermittelt werden, die aussichtsreiche Ergebnisse für den Einsatz als Biotinte lieferte. Für Chitosan erwies sich die Kombination mit oSMoMA-4 als am vielversprechendsten, während für Imagel® die besten Ergebnisse mit oSMoMA-7,5 erzielt wurden und für Gelatine oSMoMA-3,5 die optimalen Resultate zeigte. Obwohl die Imagel®-Hydrogele insgesamt vielversprechende Eigenschaften für den 3D-Druck aufwiesen, enthielten sie zum Zeitpunkt der Untersuchung noch zytotoxische Komponenten wie die Base NMPO. Daher wurden diese Hydrogele zwar für erste Versuche im 3D-Druck eingesetzt, jedoch nicht für den Gebrauch als Biotinte berücksichtigt. Zuletzt stand bei dem Wunsch nach einem deutlich festeren Hydrogel das Chitosan zur Verfügung.

Aufgrund der Zusammensetzung und der Eigenschaften der verschiedenen Hydrogele wurden die Gelatine-Hydrogele für die Entwicklung als Biotinte ausgewählt. Dazu wurde die in der Arbeitsgruppe bereits bekannte Gelatine-Formulierung erfolgreich weiterentwickelt und an oSMoMA-x als Quervernetzer angepasst. Unter anderem wurden verschiedene Konzentrationen und

Verhältnisse der Komponenten zueinander geändert, um die zytotoxischen Komponenten in den Mengen zu reduzieren und DMEM als ein Teil des Lösungsmittels für die Gelatine ergänzt, um die Suspension der Zellen zu ermöglichen. Einen großen Einfluss auf die Zellviabilität zeigte das DMSO in der Hydrogelformulierung. Im Rahmen eines separaten Versuchsteils konnte nachgewiesen werden, dass bereits Konzentrationen ab 0,4 % erste negative Effekte auf die Zellviabilität zeigten. Ab einer Konzentration von über 2,25 % wurden deutlich ausgeprägtere Effekte beobachtet, während Konzentrationen im Bereich von etwa 10 % kritisch waren und vermieden werden sollten. Aus diesem Grund wurde unter anderem die DMSO-Konzentration im resultierenden Hydrogel von 11,11 % auf 5,56 % gesenkt. Zudem wurden auch die Basen- und Oligomer-Konzentrationen erfolgreich angepasst. Die finale Biotinten-Zusammensetzung basierte auf einem Verhältnis von 55:30:5 (Gelatine:Base:Oligomer). Die Gelatine-Lösung wurde als 5,4%-ige Lösung in einer Mischung aus DMEM und demineralisiertem Wasser hergestellt, während die Oligomer-Lösung aus einer 30%-igen Lösung von oSMoMA-3,5 in DMSO bestand. Beide Biotinten unterschieden sich in ihren Gelierungskinetiken, die durch den Einsatz unterschiedlicher Basen beeinflusst wurden. Im Gegensatz zur zweiten Biotinte mit K_2HPO_4 10 %, zeigte die erste Biotinte mit TEOA 6 % eine deutlich schnellere Gelierung und höhere Festigkeit des Hydrogels. Diese Erkenntnisse konnten erfolgreich für den 3D-Druck genutzt werden. Darüber hinaus konnte die Zusammensetzung der Biotinte mit TEOA 6 % im Rahmen einer statistischen Versuchsplanung (Design of Experiments - DoE) untersucht und bestätigt werden. Dafür wurden 3 Faktoren (Konzentration der Gelatine-Lösung, Konzentration der Base und Konzentration der Oligomer-Lösung im Hydrogel) und der Speichermoduli (G') als Indikator für die Festigkeit des Hydrogels gewählt. Vor allem eine erhöhte Oligomer-Konzentration und eine erhöhte Gelatine-Konzentration führten in diesem Versuch zu einer verbesserten Festigkeit des Gelatine-Hydrogels. Angesichts des potenziellen Einflusses dieser Ergebnisse auf die Biokompatibilität des Hydrogels wurden sie ausschließlich als Anhaltspunkt betrachtet.

Ein entscheidender Faktor in der Entwicklung von Biotinten ist die Biokompatibilität. Um diese zu testen, wurden drei verschiedene Zelllinien und zwei verschiedene Zellviabilitätsreagenzien (PrestoBlue® und WST-8) untersucht. Dabei konnten sowohl Unterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien als auch Unterschiede bei der Eignung von verschiedenen Zellviabilitätsreagenzien gezeigt werden. Im Hinblick auf die Zellviabilität erzielte das Hydrogel, bestehend aus dem selbst synthetisierten oSMoMA-3,5 und Gelatine als natürlichem Biopolymer, im Vergleich zum Standard-Hydrogel aus Kollagen sogar die besseren Ergebnisse. Am Ende wurden für die Entwicklung der Biotinte die murinen embryonalen 3T3-Fibroblasten sowie für die Bestimmung der Zellviabilität WST-8 als Zellviabilitätsreagenz verwendet. Die Zellkompatibilität konnte erfolgreich für beide Biotinten über verschiedene Zeiträume (bis hin zu 21 Tagen) gezeigt werden.

Für den 3D-Druck der Biotinten wurde ein Puredyne®-Druckkopf mit einer Temperiereinheit in einen normalen 3D-Drucker implementiert und Vorversuche mit den Imager®-Hydrogelen durchgeführt. Der Einbau der Temperiereinheit ermöglichte das Beheizen des Druckkopfes auf 37 °C als optimale Umgebungstemperatur für die Zellen. Beide Biotinten, auf Basis von Gelatine-Hydrogelen, konnten erfolgreich mit eingebetteten murinen embryonalen 3T3-Fibroblasten aus einer Kartusche gedruckt werden. Dabei wurden ebenfalls zwei verschiedene Kanülen-Durchmesser mit 0,44 mm und 0,16 mm verglichen. Mikroskopische Aufnahmen und die Ergebnisse des WST-8 Assays haben gezeigt, dass es innerhalb von 7 Tagen zur Proliferation der gedruckten Zellen in dem Hydrogel kam. Für die Biotinte mit TEOA 6 % sollte jedoch die Kanüle mit 0,44 mm verwendet werden, während für die Biotinte mit K₂HPO₄ 10 % beide Kanülen-Durchmesser verwendet werden konnten. Neben dem Druck aus einer Kartusche wurden für den Zweikomponentendruck auch noch eine Halterung und ein Y-Verbindungsstück entworfen und 3D-gedruckt, die den Einbau eines zweiten Druckkopfes ermöglichten. Mit diesem Aufbau ließ sich das Verhältnis der Komponenten präzise einstellen und zunächst mit demineralisiertem Wasser überprüfen. Ausgehend von der Zusammensetzung der Biotinten wurde ein Verhältnis von 85:5 bzw. 17:1 (Gelatine + Base:Oligomer) festgelegt.

Die Ergebnisse aus vier Durchläufen zeigten, dass der vorgegebene Befehl erfolgreich umgesetzt und das eingestellte Verhältnis vom Drucker zuverlässig realisiert werden konnte. Aus diesem Grund wurden anschließend erste Versuche zum Zweikomponentendruck mit dem Gelatine-Hydrogel durchgeführt. Für zukünftige Untersuchungen wurden gezielte Verbesserungsvorschläge erarbeitet und potenzielle Optimierungsansätze für den 3D-Druck insbesondere das Design des Y-Verbindungsstücks, wie zum Beispiel das Hinzufügen eines statischen Mischelementes oder die Verringerung des Durchmessers, diskutiert.

6 Summary

“Tissue engineering”, as an important field of regenerative medicine, has gained increasing significance for replacing missing tissue either structurally or functionally. The production of new tissue requires two key components: a biocompatible material, which in this work was developed in the form of a two-component hydrogel, and the embedded cells. Together, these components are the basis for the development of bio-ink, which was the focus of this work. The development of the two-component hydrogel focused on amine-anhydride conjugation as a cross-linking reaction between synthetic (oSMoMA-x) and natural polymers (chitosan, gelatin, and Imagel®). The developed and characterized biomaterial was then used as bioink to fabricate a specific scaffold via 3D printing. Finally, the suitability of the developed bioink for 3D printing as well as the cell viability of the printed constructs was successfully demonstrated.

To reduce the cytotoxicity of the oligomer and improve its cytocompatibility, a new generation of oligomers, called oSMoMA-x, was developed. In addition to stearylacrylate (SA) as the hydrophobic building block and maleic anhydride (MA) as the functional component for crosslinking, acrylmorpholine (AMo) was added as a hydrophilic comonomer. By varying the comonomers during the synthesis process, oligomers with different anhydride contents and specific properties have been synthesized. This led to the development of a series of oligomers ranging from oSMoMA-2 to oSMoMA-10, which differed particularly in the composition of the comonomers maleic anhydride (MA) and acrylmorpholine (AMo). The various oligomers were successfully characterized using ¹H-NMR spectroscopy, GPC analysis, and titrations (conductometric titration and Brown-Fujimori titration). The number-average molecular weight of the oligomers ranged from 1500 to 3500 g/mol, while the integrity of the anhydride groups (MA) varied between 75 % and 100 %. Additionally, the ratio of acrylmorpholine (AMo) to maleic anhydride (MA), as expected, showed an increase with the rising MA content in the oligomer, which was confirmed across the series from oSMoMA-2 to oSMoMA-10.

Due to the versatility of the synthesized oligomers and the use of three different natural biopolymers (chitosan, gelatin, and Imager[®]), a series of hydrogels with different properties was produced and subsequently characterized for comparison in terms of their rheological and physicochemical properties. The characterizations included the analysis of gelation kinetics, particularly by measuring the storage modulus (G'), performing a frequency sweep on prefabricated hydrogel plates, and determining the dry weight, leachables, and water content. In some cases, the degree of cross-linking was additionally determined using the TNBS assay. To improve the mixing of the components, the use of an electronic pipette was implemented for hydrogel preparation. Each of the natural biopolymers had specific characteristic properties that had an impact on the production of the hydrogel. Nonetheless, an optimal hydrogel composition was identified for each natural biopolymer, yielding promising results for their application as bioinks. For chitosan, the most promising combination was with oSMoMA-4, while oSMoMA-7.5 gave the best results with Imager[®] and oSMoMA-3.5 showed optimal results with gelatin. Although the Imager[®] hydrogels showed overall promising properties for 3D printing, they still contained cytotoxic components such as the base NMPO at the time of the study. Therefore, while these hydrogels were used for initial 3D printing experiments, they were not considered for use as bioink. Finally, for the requirement of a significantly stiffer hydrogel, the chitosan was available.

Based on the composition and properties of the various hydrogels, the gelatin hydrogels were selected for development as bioink. The gelatin formulation already established in the research group was successfully further developed and adapted to oSMoMA-x as a crosslinker. Among other things, different concentrations and ratios of the components were modified to reduce the quantities of cytotoxic components. Additionally, DMEM was included as part of the solvent for gelatin to enable cell suspension. DMSO in the hydrogel formulation showed a significant influence on cell viability. In a separate experiment, it was demonstrated that concentrations as low as 0.4 % already had initial negative effects on cell viability. At concentrations above 2.25 %, more significant effects were observed, while concentrations around 10 % were considered critical and should be avoided. Consequently, the DMSO concentration in the resulting hydrogel was reduced from

11.11 % to 5.56 %. Moreover, the concentrations of bases and oligomers were successfully adjusted. The final bioink composition was based on a ratio of 55:30:5 (gelatin:base:oligomer). The gelatin solution was prepared as a 5.4 % solution in a mixture of DMEM and demineralized water, while the oligomer solution consisted of a 30 % solution of oSMoMA-3.5 in DMSO. The two bioinks differed in their gelation kinetics, influenced by the use of different bases. In contrast to the second bioink with 10 % K_2HPO_4 , the first bioink with 6 % TEOA showed significantly faster gelation and higher hydrogel stiffness. These findings were successfully utilized for 3D printing. Furthermore, the composition of the bioink with 6 % TEOA was examined and confirmed through statistical experimental design (Design of Experiments, DoE). For this purpose, three factors (gelatin concentration, base concentration, and oligomer concentration in the hydrogel) and the storage modulus (G') as an indicator of hydrogel stiffness were selected. An increased concentration of oligomers and gelatin particularly led to improved hydrogel stiffness in this experiment. Given the potential influence of these results on the biocompatibility of the hydrogel, they were considered as reference points only.

A crucial factor in the development of bioinks is biocompatibility. To assess this, three different cell lines and two different cell viability reagents (PrestoBlue® and WST-8) were examined. Differences were observed both between the various cell lines and in the suitability of the different cell viability reagents. In terms of cell viability, the hydrogel composed of the self-synthesized oSMoMA-3.5 and gelatin as a natural biopolymer achieved even better results compared to the standard hydrogel made from collagen. Finally, murine embryonic 3T3 fibroblasts were used for the development of the bioink, while WST-8 was selected as the cell viability reagent. The cell compatibility of both bioinks was successfully demonstrated over various time periods, extending up to 21 days.

For the 3D printing of bioinks, a Puredyne® printhead with a temperature control unit was integrated into a standard 3D printer, and preliminary tests were conducted using Imager® hydrogels. The integration of the temperature control unit enabled the heating of the printhead to 37 °C, providing an optimal environment for the cells. Both bioinks, based on gelatin hydrogels, were successfully printed from a cartridge with embedded murine embryonic 3T3 fibroblasts.

Additionally, two different needle diameters, 0.44 mm and 0.16 mm, were compared. Microscopic images and results from the WST-8 assay demonstrated cell proliferation within the hydrogel over a period of 7 days. For the bioink with 6 % TEOA, the 0.44 mm needle should be used, while for the bioink with 10 % K_2HPO_4 , both needle sizes are suitable. Besides cartridge-based printing, a holder and a Y-connector were designed and 3D printed for two-component printing, allowing the integration of a second printhead. This setup enabled precise adjustment of the component ratios, initially tested with demineralized water. Based on the composition of the bioinks, ratios of 85:5 and 17:1 (gelatin + base:oligomer) were established.

The results from four runs showed that the specified command was successfully performed, and the set ratio was reliably implemented by the printer. Consequently, initial experiments with two-component printing using the gelatin hydrogel were conducted. Suggestions for improvement were developed for future investigation and potential approaches to 3D printing optimisation were discussed, in particular the design of the Y-connector, such as the addition of a static mixing element or a reduction in diameter.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Mao AS, Mooney DJ. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(47):14452-9.
- [2] Atala A. Regenerative medicine strategies. *Journal of Pediatric Surgery*. 2012;47(1):17-28.
- [3] Katari R, Peloso A, Orlando G. Tissue engineering and regenerative medicine: semantic considerations for an evolving paradigm. *Biotechnol J*. 2015;2(57):1-6.
- [4] Ma PX. Scaffolds for tissue fabrication. *Materials Today*. 2004;7(5):30-40.
- [5] Rahmati M, Pennisi CP, Budd E, Mobasheri A, Mozafari M. Biomaterials for regenerative medicine: Historical perspectives and current trends. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1119:1-19.
- [6] Bhat S, Kumar A. Biomaterials in regenerative medicine. *Journal of Postgraduate Medicine, Education and Research*. 2014;46(2):81-9.
- [7] Chen Q, Thouas GA. Metallic implant biomaterials. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 2015;87:1-57.
- [8] Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005;26(27):5474-91.
- [9] O'brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. 2011;14(3):88-95.
- [10] Hollister SJ. Scaffold design and manufacturing: From concept to clinic. *Advanced Materials*. 2009;21(32-33):3330-42.
- [11] Liu C, Xia Z, Czernuszka JT. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Chemical Engineering Research and Design*. 2007;85(7):1051-64.
- [12] Ullah F, Othman MBH, Javed F, Ahmad Z, Akil HM. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C*. 2015;57:414-33.
- [13] Saldin LT, Cramer MC, Velankar SS, White LJ, Badylak SF. Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. *Acta Biomaterialia*. 2017;49:1-15.
- [14] Fan J, Abedi-Dorcheh K, Sadat Vaziri A, Kazemi-Aghdam F, Rafieyan S, Sohrabinejad M, et al. A review of recent advances in natural polymer-based scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Polymers*. 2022;14(10):2097.
- [15] Zhang YS, Khademhosseini A. Advances in engineering hydrogels. *Science*. 2017;356(6337):eaaf3627.
- [16] Ho T-C, Chang C-C, Chan H-P, Chung T-W, Shu C-W, Chuang K-P, et al. Hydrogels: Properties and applications in biomedicine. *Molecules*. 2022;27(9):2902.
- [17] Stojkov G, Niyazov Z, Picchioni F, Bose RK. Relationship between structure and rheology of hydrogels for various applications. *Gels*. 2021;7(4):255.

-
- [18] Holt SE, Ward ES, Ober RJ, Alge DL. Shooting for the moon: using tissue-mimetic hydrogels to gain new insight on cancer biology and screen therapeutics. *Materials Research Society* 2017;7(3):427-41.
- [19] Wong Po Foo CT, Lee JS, Mulyasmita W, Parisi-Amon A, Heilshorn SC. Two-component protein-engineered physical hydrogels for cell encapsulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(52):22067-72.
- [20] Krieghoff J, Rost J, Kohn-Polster C, Müller BM, Koenig A, Flath T, *et al.* Extrusion-printing of multi-channeled two-component hydrogel constructs from gelatinous peptides and anhydride-containing oligomers. *Biomedicines*. 2021;9(4):370.
- [21] Nawaz HA, Schröck K, Schmid M, Krieghoff J, Maqsood I, Kascholke C, *et al.* Injectable oligomer-cross-linked gelatine hydrogels via anhydride–amine-conjugation. *Journal of Materials Chemistry B*. 2021;9(9):2295-307.
- [22] Gungor-Ozkerim PS, Inci I, Zhang YS, Khademhosseini A, Dokmeci MR. Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomaterials Science*. 2018;6(5):915-46.
- [23] Daly AC, Prendergast ME, Hughes AJ, Burdick JA. Bioprinting for the biologist. *Cell*. 2021;184(1):18-32.
- [24] Sun W, Starly B, Daly AC, Burdick JA, Groll J, Skeldon G, *et al.* The bioprinting roadmap. *Biofabrication*. 2020;12(2):022002.
- [25] Bian L. Functional hydrogel bioink, a key challenge of 3D cellular bioprinting. *APL Bioengineering*. 2020;4(3).
- [26] Hospodiuk M, Dey M, Sosnoski D, Ozbolat IT. The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. *Biotechnology Advances*. 2017;35(2):217-39.
- [27] Chimene D, Kaunas R, Gaharwar AK. Hydrogel bioink reinforcement for additive manufacturing: A focused review of emerging strategies. *Advanced Materials*. 2020;32(1):1902026.
- [28] Unagolla JM, Jayasuriya AC. Hydrogel-based 3D bioprinting: A comprehensive review on cell-laden hydrogels, bioink formulations, and future perspectives. *Applied Materials Today*. 2020;18:100479.
- [29] Maqsood I. Injectable oligomer-cross-linked chitosan hydrogels and nanocomposites (Dissertation). Leipzig, Deutschland: Universität Leipzig; 2020.
- [30] Nawaz HA. Injectable oligomer-cross-linked gelatin hydrogels for regenerative applications (Dissertation). Leipzig, Deutschland: Universität Leipzig; 2018.
- [31] Cooke ME, Rosenzweig DH. The rheology of direct and suspended extrusion bioprinting. *APL Bioengineering*. 2021;5(1).
- [32] Puertas-Bartolomé M, Włodarczyk-Biegun MK, Del Campo A, Vázquez-Lasa B, San Román J. 3D printing of a reactive hydrogel bio-ink using a static mixing tool. *Polymers*. 2020;12(9):1986.
- [33] Tan H, Chu CR, Payne KA, Marra KG. Injectable in situ forming biodegradable chitosan–hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2009;30(13):2499-506.

-
- [34] Taghipour YD, Hokmabad VR, Bakhshayesh D, Rahmani A, Asadi N, Salehi R, *et al.* The application of hydrogels based on natural polymers for tissue engineering. *Current Medicinal Chemistry*. 2020;27(16):2658-80.
- [35] Ahmad MI, Li Y, Pan J, Liu F, Dai H, Fu Y, *et al.* Collagen and gelatin: Structure, properties, and applications in food industry. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023:128037.
- [36] Salahuddin B, Wang S, Sangian D, Aziz S, Gu Q. Hybrid gelatin hydrogels in nanomedicine applications. *Applied Bio Materials*. 2021;4(4):2886-906.
- [37] Guo L, Liang Z, Yang L, Du W, Yu T, Tang H, *et al.* The role of natural polymers in bone tissue engineering. *Journal of Controlled Release*. 2021;338:571-82.
- [38] Zhao W, Jin X, Cong Y, Liu Y, Fu J. Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2013;88(3):327-39.
- [39] Naomi R, Bahari H, Ridzuan PM, Othman F. Natural-based biomaterial for skin wound healing (gelatin vs. collagen): Expert review. *Polymers*. 2021;13(14):2319.
- [40] Campiglio CE, Contessi Negrini N, Farè S, Draghi L. Cross-linking strategies for electrospun gelatin scaffolds. *Materials*. 2019;12(15):2476.
- [41] Peptiplus® Kollagenprotein. Eberbach, Deutschland: GELITAG; [zitiert am 26.07.2024]. Verfügbar unter: <https://www.gelita.com/de/produkte-und-marken/kollagenpeptide/peptiplus>
- [42] Peers S, Montembault A, Ladavière C. Chitosan hydrogels for sustained drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2020;326:150-63.
- [43] Fu J, Yang F, Guo Z. The chitosan hydrogels: From structure to function. *New Journal of Chemistry*. 2018;42(21):17162-80.
- [44] Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010;62(1):83-99.
- [45] Hacker MC, Klouda L, Ma BB, Kretlow JD, Mikos AG. Synthesis and characterization of injectable, thermally and chemically gelable, amphiphilic poly (N-isopropylacrylamide)-based macromers. *Biomacromolecules*. 2008;9(6):1558-70.
- [46] Loth T, Hennig R, Kascholke C, Hötzel R, Hacker MC. Reactive and stimuli-responsive maleic anhydride containing macromers—multi-functional cross-linkers and building blocks for hydrogel fabrication. *Reactive and Functional Polymers*. 2013;73(11):1480-92.
- [47] Kascholke C, Loth T, Kohn-Polster C, Möller S, Bellstedt P, Schulz-Siegmund M, *et al.* Dual-functional hydrazide-reactive and anhydride-containing oligomeric hydrogel building blocks. *Biomacromolecules*. 2017;18(3):683-94.
- [48] Kohn C, Klemens J, Kascholke C, Murthy N, Kohn J, Brandenburger M, *et al.* Dual-component collagenous peptide/reactive oligomer hydrogels as potential nerve guidance materials—from characterization to functionalization. *Biomaterials Science*. 2016;4(11):1605-21.

- [49] Loth T, Hötzel R, Kascholke C, Anderegg U, Schulz-Siegmund M, Hacker MC. Gelatin-based biomaterial engineering with anhydride-containing oligomeric cross-linkers. *Biomacromolecules*. 2014;15(6):2104-18.
- [50] PUREDYNE®. Töging am Inn, Deutschland: ViscoTec Pumpen- u. Dosiertechnik GmbH; [zitiert am 10.07.2024]. Verfügbar unter: <https://www.puredyne.com/de/>.
- [51] Ladavière C, Delair T, Domard A, Pichot C, Mandrand B. Studies of the thermal stability of maleic anhydride co-polymers in aqueous solution. *Polym Degrad Stab*. 1999;65(2):231-41.
- [52] Dougherty J, Lynch-O'Brien L, Mahamoud L. Acrylol morpholine for UV curing. *RadTech Report*. 2007;21:22-9.
- [53] Tallon MA. Reactions Involving Maleic Anhydride. In: Musa OM, editor. *Handbook of maleic anhydride based materials: Syntheses, properties and applications*. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 59-149.
- [54] Meibohm B, Zhou H. Characterizing the impact of renal impairment on the clinical pharmacology of biologics. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2012;52(S1):54S-62S.
- [55] Stepto RF. Dispersity in polymer science (IUPAC Recommendations 2009). *Pure and Applied Chemistry*. 2009;81(2):351-3.
- [56] Whitfield R, Truong NP, Messmer D, Parkatzidis K, Rolland M, Anastasaki A. Tailoring polymer dispersity and shape of molecular weight distributions: methods and applications. *Chemical Science*. 2019;10(38):8724-34.
- [57] Pompe T, Renner L, Grimmer M, Herold N, Werner C. Functional films of maleic anhydride copolymers under physiological conditions. *Macromolecular Bioscience*. 2005;5(9):890-5.
- [58] Brown A, Fujimori K. A method for the determination of maleic anhydride content in copolymers. *Polymer Bulletin*. 1986;16:441-4.
- [59] D'Agosto F, Charreyre M-T, Veron L, Llauro M-F, Pichot C. Kinetic study of free-radical solution copoly- merization of N-acryloylmorpholine with an activated ester-type monomer, N-acryloxysuccinimide. *Macromolecular Chemistry and Physics*. 2001;202(9):1689-99.
- [60] Tariq M, Khokhar R, Javed A, Usman M, Anjum SMM, Rasheed H, *et al.* Novel hydrophilic oligomer-crosslinked gelatin-based hydrogels for biomedical applications. *Gels*. 2023;9(7):564.
- [61] Gstraunthaler G, Lindl T. *Zell-und Gewebekultur*. Berlin, Deutschland: 8. Auflage. Springer Spektrum; 2013.
- [62] Mantha S, Pillai S, Khayambashi P, Upadhyay A, Zhang Y, Tao O, *et al.* Smart hydrogels in tissue engineering and regenerative medicine. *Materials*. 2019;12(20):3323.
- [63] Ting MS, Travas-Sejdic J, Malmström J. Modulation of hydrogel stiffness by external stimuli: soft materials for mechanotransduction studies. *Journal of Materials Chemistry B*. 2021;9(37):7578-96.
- [64] Mezger TG. *Angewandte Rheologie*. Graz, Österreich: 5. Auflage. Anton Paar GmbH; 2020.

-
- [65] Soofi SS, Last JA, Liliensiek SJ, Nealey PF, Murphy CJ. The elastic modulus of Matrigel™ as determined by atomic force microscopy. *Journal of Structural Biology*. 2009;167(3):216-9.
- [66] Fan R, Piou M, Darling E, Cormier D, Sun J, Wan J. Bio-printing cell-laden Matrigel–agarose constructs. *Journal of Biomaterials Applications*. 2016;31(5):684-92.
- [67] Geisler IM, Schneider JP. Evolution-based design of an injectable hydrogel. *Advanced Functional Materials*. 2012;22(3):529-37.
- [68] Jeznach O, Kołbuk D, Sajkiewicz P. Injectable hydrogels and nanocomposite hydrogels for cartilage regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2018;106(10):2762-76.
- [69] Overstreet DJ, Dutta D, Stabenfeldt SE, Vernon BL. Injectable hydrogels. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 2012;50(13):881-903.
- [70] Geckil H, Xu F, Zhang X, Moon S, Demirci U. Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Nanomedicine*. 2010;5(3):469-84.
- [71] Kozłowski MT, Crook CJ, Ku HT. Towards organoid culture without Matrigel. *Communications Biology*. 2021;4(1):1387.
- [72] Sodunke TR, Turner KK, Caldwell SA, McBride KW, Reginato MJ, Noh HM. Micropatterns of Matrigel for three-dimensional epithelial cultures. *Biomaterials*. 2007;28(27):4006-16.
- [73] Mortimer S, Ryan AJ, Stanford JL. Rheological behavior and gel-point determination for a model Lewis acid-initiated chain growth epoxy resin. *Macromolecules*. 2001;34(9):2973-80.
- [74] Hiemstra C, van der Aa LJ, Zhong Z, Dijkstra PJ, Feijen J. Rapidly in situ-forming degradable hydrogels from dextran thiols through Michael addition. *Biomacromolecules*. 2007;8(5):1548-56.
- [75] Pillai CK, Paul W, Sharma CP. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*. 2009;34(7):641-78.
- [76] Manish V, Arockiarajan A, Tamadapu G. Influence of water content on the mechanical behavior of gelatin based hydrogels: Synthesis, characterization, and modeling. *International Journal of Solids and Structures*. 2021;233:111219.
- [77] Tran VT, Mredha MTI, Jeon I. High-water-content hydrogels exhibiting superior stiffness, strength, and toughness. *Extreme Mechanics Letters*. 2020;37:100691.
- [78] Appel EA, Loh XJ, Jones ST, Biedermann F, Dreiss CA, Scherman OA. Ultrahigh-water-content supramolecular hydrogels exhibiting multistimuli responsiveness. *Journal of the American Chemical Society*. 2012;134(28):11767-73.
- [79] Luo Y, Wei X, Huang P. 3D bioprinting of hydrogel-based biomimetic microenvironments. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2019;107(5):1695-705.
- [80] Reichardt C, Welton T. Empirical parameters of solvent polarity. *Solvents and solvent effects in organic chemistry: Wiley-VCH Verlag*; 2010. p. 425-508.

- [81] Hoang Thi TT, Lee JS, Lee Y, Park K, Park K. Enhanced cellular activity in gelatin-poly(ethylene glycol) hydrogels without compromising gel stiffness. *Macromolecular Bioscience*. 2015;16.
- [82] Thonhoff JR, Lou DI, Jordan PM, Zhao X, Wu P. Compatibility of human fetal neural stem cells with hydrogel biomaterials in vitro. *Brain Research*. 2008;1187:42-51.
- [83] Andersen T, Auk-Emblem P, Dornish M. 3D cell culture in alginate hydrogels. *Microarrays*. 2015;4(2):133-61.
- [84] Milano F, Masi A, Madaghiele M, Sannino A, Salvatore L, Gallo N. Current trends in gelatin-based drug delivery systems. *Pharmaceutics*. 2023;15(5):1499.
- [85] Walter SC. Untersuchung von Hydrogelen hinsichtlich ihrer Eignung für die Kultivierung von Stammzellen (Dissertation). Lübeck, Deutschland: Universität zu Lübeck 2017.
- [86] Siemsen K. Bio – Matrices interaction – from microstructured hydrogel volumes and hydrogel surfaces Kiel, Deutschland: Christian-Albrechts Universität zu Kiel; 2020.
- [87] Giuseppe MD, Law N, Webb B, A. Macrae R, Liew LJ, Sercombe TB, *et al.* Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2018;79:150-7.
- [88] Scarcello E, Lambremont A, Vanbever R, Jacques PJ, Lison D. Mind your assays: Misleading cytotoxicity with the WST-1 assay in the presence of manganese. *PloS One*. 2020;15(4):e0231634.
- [89] Klouda L, Hacker MC, Kretlow JD, Mikos AG. Cytocompatibility evaluation of amphiphilic, thermally responsive and chemically crosslinkable macromers for in situ forming hydrogels. *Biomaterials*. 2009;30(27):4558-66.
- [90] Nguyen ST, Nguyen HT-L, Truong KD. Comparative cytotoxic effects of methanol, ethanol and DMSO on human cancer cell lines. *Biomedical Research and Therapy*. 2020;7(7):3855-9.
- [91] Qi W, Ding D, Salvi RJ. Cytotoxic effects of dimethyl sulphoxide (DMSO) on cochlear organotypic cultures. *Hearing Research*. 2008;236(1-2):52-60.
- [92] He K, Wang X. Rapid prototyping of tubular polyurethane and cell/hydrogel constructs. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2011;26(4):363-74.
- [93] Kohn-Polster C. Oligomer-vernetzte Gelatine Hydrogele für den Einsatz in der peripheren Nervenregeneration (Dissertation). Leipzig, Deutschland: Universität Leipzig; 2019.
- [94] Jamalzadeh L, GHAFORI H, Sariri R, Rabuti H, Nasirzade J, Hasani H, *et al.* Cytotoxic effects of some common organic solvents on MCF-7, RAW-264.7 and human umbilical vein endothelial cells. *Avicenna Journal of Medical Biochemistry*. 2016;4(1):e33453.
- [95] Arora M. Cell culture media: A review. *Mater Methods*. 2013;3(175):24.
- [96] Itoh S, Ohtaki H. A study of the liquid structure of dimethyl sulfoxide by the X-ray diffraction. *Zeitschrift für Naturforschung* 1987;42(8):858-62.

-
- [97] Yao T, Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive Medicine and Biology*. 2017;16(2):99-117.
- [98] Ouyang L, Yao R, Zhao Y, Sun W. Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells. *Biofabrication*. 2016;8(3):035020.
- [99] Jaipan P, Nguyen A, Narayan RJ. Gelatin-based hydrogels for biomedical applications. *Materials Research Society* 2017;7(3):416-26.
- [100] Rohanizadeh R, Swain MV, Mason RS. Gelatin sponges (Gelfoam®) as a scaffold for osteoblasts. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2008;19:1173-82.
- [101] Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2000;50(1):27-46.
- [102] Park HE, Gasek N, Hwang J, Weiss DJ, Lee PC. Effect of temperature on gelation and cross-linking of gelatin methacryloyl for biomedical applications. *Physics of Fluids*. 2020;32(3):033102.
- [103] Allhenn D, Lamprecht A. Microsphere preparation using the un toxic solvent glycofurol. *Pharmaceutical Research*. 2011;28:563-71.
- [104] Gao F, Bai R, Ferlin F, Vaccaro L, Li M, Gu Y. Replacement strategies for non-green dipolar aprotic solvents. *Green Chemistry*. 2020;22(19):6240-57.
- [105] Sherwood J, Constantinou A, Moity L, McElroy CR, Farmer TJ, Duncan T, *et al.* Dihydrolevoglucosenone (Cyrene) as a bio-based alternative for dipolar aprotic solvents. *Chemical Communications*. 2014;50(68):9650-2.
- [106] Qin C, Li H, Xiao Q, Liu Y, Zhu J, Du Y. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*. 2006;63(3):367-74.
- [107] Sogias IA, Khutoryanskiy VV, Williams AC. Exploring the factors affecting the solubility of chitosan in water. *Macromolecular Chemistry and Physics*. 2010;211(4):426-33.
- [108] Cho J, Heuzey M-C, Bégin A, Carreau PJ. Physical gelation of chitosan in the presence of β -glycerophosphate: the effect of temperature. *Biomacromolecules*. 2005;6(6):3267-75.
- [109] Il'na A, Varlamov V. Hydrolysis of chitosan in lactic acid. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2004;40:300-3.
- [110] Coelho M, Cabral AT, Fernandes M. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in α -MEM and in DMEM. *Biomaterials*. 2000;21(11):1087-94.
- [111] Schlede E, Mischke U, Roll R, Kayser D. A national validation study of the acute-toxic-class method- An alternative to the LD 50 test. *Archives of Toxicology*. 1992;66:455-70.
- [112] Kang Y, Guan Y, Li S. Innovative hydrogel solutions for articular cartilage regeneration: a comprehensive review. *International Journal of Surgery*. 2024;110(12):7984-8001.

- [113] Bo T, Pascucci E, Capuani S, Campa-Carranza JN, Franco L, Farina M, *et al.* 3D bioprinted mesenchymal stem cell laden scaffold enhances subcutaneous vascularization for delivery of cell therapy. *Biomedical Microdevices*. 2024;26(3):29.
- [114] Jouyban A, Fakhree MAA, Shayanfar A. Review of pharmaceutical applications of N-methyl-2-pyrrolidone. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2010;13(4):524-35.
- [115] Mora A-S, Tayouo R, Boutevin B, David G, Caillol S. A perspective approach on the amine reactivity and the hydrogen bonds effect on epoxy-amine systems. *European Polymer Journal*. 2020;123:109460.
- [116] Kalkandelen C, Ozbek B, Ergul N, Akyol S, Moukbil Y, Oktar F, *et al.* Effect of temperature, viscosity and surface tension on gelatine structures produced by modified 3D printer. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng*. 2017;293 012001.
- [117] Ball V. Specific ion effects in hydrogels. *Molecules*. 2024;29(24):5990.
- [118] Schmitz S. Kryokonservierung und Langzeitlagerung von Zellen. *Der Experimentator: Zellkultur*: Springer; 2009. p. 193-206.
- [119] Hamri S, Bouchaour T. pH-dependent swelling behaviour of interpenetrating polymer network hydrogels based on poly (hydroxybutyl methacrylate) and poly (2-hydroxyethyl methacrylate). *International Journal of Plastics Technology*. 2016;20(2):279-93.
- [120] Li Z, Huang S, Liu Y, Yao B, Hu T, Shi H, *et al.* Tuning alginate-gelatin bioink properties by varying solvent and their impact on stem cell behavior. *Scientific Reports*. 2018;8(1):8020.
- [121] Bociaga D, Bartniak M, Grabarczyk J, Przybyszewska K. Sodium alginate/gelatine hydrogels for direct bioprinting—The effect of composition selection and applied solvents on the bioink properties. *Materials*. 2019;12(17):2669.
- [122] Chung JH, Naficy S, Yue Z, Kapsa R, Quigley A, Moulton SE, *et al.* Bio-ink properties and printability for extrusion printing living cells. *Biomaterials Science*. 2013;1(7):763-73.
- [123] Mackenzie CG, Mackenzie JB, Beck P. The effect of pH on growth, protein synthesis, and lipid-rich particles of cultured mammalian cells. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. 1961;9(1):141-56.
- [124] Matsumoto A, Yoshida R, Kataoka K. Glucose-responsive polymer gel bearing phenylborate derivative as a glucose-sensing moiety operating at the physiological pH. *Biomacromolecules*. 2004;5(3):1038-45.
- [125] Claus J. Charakterisierung von Hydrogel-Eigenschaften und ihre Anwendung als Drug-Delivery-System (Dissertation). Rostock, Deutschland: Universität Rostock; 2020.
- [126] Plikus MV, Wang X, Sinha S, Forte E, Thompson SM, Herzog EL, *et al.* Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell*. 2021;184(15):3852-72.

- [127] Wiebe-Ben Zakour KE, Kaya S, Matros JC, Hacker MC, Cheikh-Rouhou A, Spaniol K, *et al.* Enhancement of lacrimal gland cell function by decellularized lacrimal gland derived hydrogel. *Biofabrication*. 2024;16(2):025008.
- [128] PrestoBlue™ Zellviabilitätsreagenz. Darmstadt, Deutschland: Thermo Fisher Scientific; [zitiert am 15.07.2024]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/de/A13261>.
- [129] ROTITEST® Vital, 20 ml, 4 x 5 ml. Karlsruhe, Deutschland: Carl Roth GmbH + Co. KG; [zitiert am 15.07.2024]. Verfügbar unter: <https://www.carlroth.com/de/de/vitalitaetsassay-zellzaehlung/rotestvital/p/0069.2>.
- [130] Dubbin K, Hori Y, Lewis KK, Heilshorn SC. Dual-stage crosslinking of a gel-phase bioink improves cell viability and homogeneity for 3D bioprinting. *Adv Healthc Mater*. 2016;5(19):2488-92.
- [131] Park J, Lee SJ, Chung S, Lee JH, Kim WD, Lee JY, *et al.* Cell-laden 3D bioprinting hydrogel matrix depending on different compositions for soft tissue engineering: Characterization and evaluation. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;71:678-84.
- [132] Zupan J. Mesenchymal stem/stromal cells and fibroblasts: their roles in tissue injury and regeneration, and age-related degeneration. 2021.
- [133] Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A*. 2018;93(1):19-31.
- [134] Barbieri MA, Roberts RL, Gumusboga A, Highfield H, Alvarez-Dominguez C, Wells A, *et al.* Epidermal growth factor and membrane trafficking: EGF receptor activation of endocytosis requires Rab5a. *The Journal of Cell Biology*. 2000;151(3):539-50.
- [135] Dezfuli SN, Huan Z, Mol J, Leeftang M, Chang J, Zhou J. Influence of HEPES buffer on the local pH and formation of surface layer during in vitro degradation tests of magnesium in DMEM. *Progress in Natural Science: Materials International*. 2014;24(5):531-8.
- [136] Paunescu V, Bojin FM, Tatu CA, Gavriluc OI, Rosca A, Gruia AT, *et al.* Tumour-associated fibroblasts and mesenchymal stem cells: more similarities than differences. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2011;15(3):635-46.
- [137] Choi H, Choi W-S, Jeong J-O. A review of advanced hydrogel applications for tissue engineering and drug delivery systems as biomaterials. *Gels*. 2024;10(11):693.
- [138] Figueiredo L, Pace R, D'Arros C, Réthoré G, Guicheux J, Le Visage C, *et al.* Assessing glucose and oxygen diffusion in hydrogels for the rational design of 3D stem cell scaffolds in regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2018;12(5):1238-46.
- [139] Wang MO, Etheridge JM, Thompson JA, Vorwald CE, Dean D, Fisher JP. Evaluation of the in vitro cytotoxicity of cross-linked biomaterials. *Biomacromolecules*. 2013;14(5):1321-9.

- [140] Schmidt AJ, Lee JM, An G. Media and environmental effects on phenolics production from tobacco cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 1989;33(11):1437-44.
- [141] Chen X, Thibeault S, editors. Effect of DMSO concentration, cell density and needle gauge on the viability of cryopreserved cells in three dimensional hyaluronan hydrogel. 2013 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC); 2013 3-7 July 2013.
- [142] Gillispie G, Prim P, Copus J, Fisher J, Mikos AG, Yoo JJ, *et al.* Assessment methodologies for extrusion-based bioink printability. *Biofabrication*. 2020;12(2):022003.
- [143] Crook JM. 3D Bioprinting. New York, USA: Springer Science+Business Media, LLC; 2020.
- [144] Webb B, Doyle BJ. Parameter optimization for 3D bioprinting of hydrogels. *Bioprinting*. 2017;8:8-12.
- [145] Abercrombie M. Fibroblasts. *Journal of Clinical Pathology*. 1978;12:1-6.
- [146] Boularaoui S, Al Hussein G, Khan KA, Christoforou N, Stefanini C. An overview of extrusion-based bioprinting with a focus on induced shear stress and its effect on cell viability. *Bioprinting*. 2020;20:e00093.
- [147] Piras CC, Smith DK. Multicomponent polysaccharide alginate-based bioinks. *Journal of Materials Chemistry B*. 2020;8(36):8171-88.
- [148] Kjar A, McFarland B, Mecham K, Harward N, Huang Y. Engineering of tissue constructs using coaxial bioprinting. *Bioactive Materials*. 2021;6(2):460-71.
- [149] Shao L, Gao Q, Xie C, Fu J, Xiang M, He Y. Directly coaxial 3D bioprinting of large-scale vascularized tissue constructs. *Biofabrication*. 2020;12(3):035014.
- [150] Feng F, He J, Li J, Mao M, Li D. Multicomponent bioprinting of heterogeneous hydrogel constructs based on microfluidic printheads. *International Journal of Bioprinting*. 2019;5(2):202.
- [151] Pagan E, Stefanek E, Seyfoori A, Razzaghi M, Chehri B, Mousavi A, *et al.* A handheld bioprinter for multi-material printing of complex constructs. *Biofabrication*. 2023;15(3):035012.
- [152] Bhattacharyya A, Janarthanan G, Tran HN, Ham HJ, Yoon J, Noh I. Bioink homogeneity control during 3D bioprinting of multicomponent micro/nanocomposite hydrogel for even tissue regeneration using novel twin screw extrusion system. *Chemical Engineering Journal*. 2021;415:128971.
- [153] Zhou Y, Liao S, Tao X, Xu X-Q, Hong Q, Wu D, *et al.* Spider-inspired multicomponent 3D printing technique for next-generation complex biofabrication. *Applied Bio Materials*. 2018;1(2):502-10.

8 Danksagung

Zuerst gilt mein herzlicher Dank meinem Doktorvater Jun.-Prof. Dr. Michael Hacker für die Möglichkeit und das entgegengebrachte Vertrauen meine Doktorarbeit in diesem Arbeitskreis anfertigen zu dürfen. Du hast Dir immer Zeit für uns genommen unabhängig davon, wie voll Dein Kalender war und immer versucht mit mir Lösungen für die aufgetretenen Probleme zu finden. Der Austausch in unseren wöchentlichen Meetings wird mir fehlen. Vielen Dank auch für die Möglichkeit an Kongressen und Konferenzen teilnehmen zu können.

Bei meinem Mentor Herrn Prof. Dr. Jörg Breitzkreutz möchte ich mich für die Übernahme des Koreferats und die Kontaktherstellung zu Herrn Jun.-Prof. Dr. Michael Hacker bedanken. Sie hatten immer und zu jeder Zeit ein offenes Ohr für jegliche Art von Frage oder Problemen während meiner Promotionszeit am Institut.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Peter Kleinebudde und Frau Prof. Dr. Anne Seidlitz danke ich für die vielen fachlichen Ratschläge und andere Blickwinkel auf meine Arbeit während den Fokusgruppen oder Doktorandenvorträgen. Ein zusätzlicher Dank geht noch an Frau Prof. Dr. Anne Seidlitz für die Möglichkeit das Zelllabor in dem 25-er Gebäude für die letzten Monate nutzen zu dürfen. Die beiden Betreuungssemester mit Dir in der Biopharmazie haben mir sehr viel Spaß gemacht.

Durch die Errichtung und Neuausstattung der Labore für den neuen Arbeitskreis von Herrn Jun.-Prof. Dr. Michael Hacker, mussten viele Utensilien bestellt oder individuell angefertigt werden. Für Eure Unterstützung in der Zeit, möchte ich besonders bei Frau Simone Mönninghoff-Pützer, Herrn Stefan Stich und Frau Vanessa Weggen danken.

Ein großer Dank geht an Andrea Michael. Vielen Dank für Deinen unermüdlichen Einsatz in der Zellkultur besonders in den letzten Monaten meiner Promotion. Ich wusste, dass ich mich immer zu 100 % auf Dich verlassen konnte und dass die Zellen immer in guten Händen sind, auch wenn ich mal nicht da war. Ich werde unsere Gespräche an der LAF vermissen und bin froh, dass eine so gute Freundschaft daraus entstanden ist.

Dem Labor der Experimentellen Ophthalmologie des Universitätsklinikums Düsseldorf und dort besonders Katharina Wiebe-Ben Zakour, Dr. Joana Witt, Luis Grumm und Annika Lumpes möchte ich für die letzten 4 Jahre danken. Ihr seid in der Zeit ein kleiner zweiter Arbeitskreis für mich geworden und ohne Euch wären die Zellversuche in dem Umfang, in dem ich sie zum Ende hin noch machen konnte, nicht möglich gewesen. Katharina danke für Deine Ausdauerkraft mir die Zellkultur zu verinnerlichen. Johanna Hölken und Anna-Lena Wurz aus dem Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Nicole Teusch an der HHU danke ich ebenfalls für die Zellversuche, die wir gemeinsam machen konnten.

Bei unseren 3D-Druckspezialisten Dr. Tobias Auel, Aaron Christofer Mentrup und Lee Roy Oldfield möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft und all die Sachen bedanken, die Ihr in der Zeit mit mir für meine Promotionsarbeit entworfen bzw. gedruckt habt. Eure Expertise hat mir viel Zeit und Mühen erspart. Bei Dr. Stefan Klinken-Uth und Dr. Katharina Kirichenko möchte ich mich für die Zeit und Hilfe bei den DoE-Experimenten bedanken.

Der Firma Puredyne® by ViscoTec und vor allem Raphael Lichtnecker möchte ich vor allem für den Umbau des 3D-Druckers und die Unterstützung bei dem Umgang mit dem 3D-Drucker in den letzten Jahren danken. Ihr alle hattet immer Zeit, falls es Probleme mit dem Drucker bzw. Druckkopf gab, das war so nicht selbstverständlich.

Meinen beiden Büro-Kollegen Charline Hoffmann und Maximilian Schulz danke ich für die wunderschöne Zeit, die wir gemeinsam in unserem abgelegenen Büro hatten. Auch wenn es manchmal verrückt war, werde ich die Zeit mit Euch beiden dort nie vergessen. Ich würde sagen wir sind gemeinsam durch dick und dünn gegangen und konnten fachlich und privat über alles reden. Ich habe die Zeit mit Euch, Josepha, Helga und Günther sehr genossen. Chi- besonders die erste Zeit am Institut, in der es darum ging den Arbeitskreis neu aufzubauen, die Labore einzurichten und wir ein Arbeitskreis aus zwei Doktorandinnen waren, werde ich mit all den Höhen und Tiefen nie vergessen.

Bei unserem dritten Arbeitskreis-Mitglied Johannes „Jonathan“ Reiß möchte ich mich für die vielen fachlichen Diskussionen besonders über den chemischen Teil meiner Promotionsarbeit und auch allen Gesprächen und Aktivitäten neben der Promotion bedanken. Egal was war, man konnte immer auf Deine Unterstützung zählen. Danke auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit!

Ein Dank geht auch nach Leipzig an Dr. Jan Krieghoff. Ich konnte Dich zu jeder Zeit erreichen und Dich noch so viele Kleinigkeiten fragen, die für Dich wahrscheinlich trivial klangen. Danke, dass Du uns mit so viel Mühe und Hilfsbereitschaft bei der Einrichtung der Labore und den ersten Experimenten unterstützt hast.

Der 25-er Crew (Ihr wisst, wer gemeint ist), danke ich für die Aufnahme in den letzten Monaten meiner Zeit am Institut. Wenn ich mal eine Auszeit vom Alltag in der Zellkultur gebraucht habe, war immer jemand von Euch da, um sich mit einem Kaffee und Süßigkeiten abzulenken. Besonders Finn Siebel und Lukas Lammerding danke ich für die vielen gemeinsamen Erlebnisse am Institut. #besteKaffeemaschine.

Bei Dr. Valentina Lura möchte ich mich für die gemeinsame Zeit im Studium und der Promotion bedanken. Egal bei welcher Fragestellung ich nicht weiterkam, du hattest immer ein offenes Ohr für mich. Genauso möchte ich mich bei Dr. Sebastian Bollmann („Bolle“) für die Unterstützung meiner IT-Probleme am Anfang der Promotion bedanken, die in vielen langen Gesprächen geendet sind. Danke!

Allen anderen nicht namentlich genannten Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen und Doktoranden und Doktorandinnen danke ich für die gemeinsame Zeit am Institut, die wir dort verbringen durften. Danke für die vielen gemeinsamen Abende, Mittagspausen und fachlichen Diskussionen, die wir gemeinsam teilen konnten. Besonders die Konferenzen mit all den besonderen Vorkommnissen werde ich nie vergessen.

Meiner Familie danke ich für Eure grenzenlose Unterstützung während den letzten Jahren der Promotion aber auch schon während des Studiums. Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen!

Swen- mein allergrößter Dank gilt Dir. Danke für Deine liebevolle Unterstützung, aufbauenden Worte und Deine Aufheiterungen, falls mal etwas nicht funktioniert hat. Zu Hause auch mal den Promotions-Alltag zu vergessen, hat mir sehr geholfen.

9 Eidesstaatliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Julia Carmen Matros