

Aus der Klinik für Herzchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg

3D-Bioprinting von ovinen Aortenklappenzellen

- Eine systematische Untersuchung
des Einflusses von Hydrogel- und Druckeigenschaften auf die Zellviabilität -

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Fábio dos Santos Adrego
2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Timm J. Filler

Gewidmet an meine Familie.

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Immohr MB, **dos Santos Adrego F**, Teichert HL, Schmidt V, Sugimura Y, Bauer S, Barth M, Lichtenberg A, Akhyari P. 3D-bioprinting of aortic valve interstitial cells: impact of hydrogel and printing parameters on cell viability. *Biomed Mater*. 2022 Nov 11;18(1). doi: 10.1088/1748-605X/ac9f91. PMID: 36322974.

Immohr MB, Teichert HL, **dos Santos Adrego F**, Schmidt V, Sugimura Y, Bauer SJ, Barth M, Lichtenberg A, Akhyari P. Three-Dimensional Bioprinting of Ovine Aortic Valve Endothelial and Interstitial Cells for the Development of Multicellular Tissue Engineered Tissue Constructs. *Bioengineering (Basel)*. 2023 Jun 30;10(7):787. doi: 10.3390/bioengineering10070787. PMID: 37508814; PMCID: PMC10376021.

ZUSAMMENFASSUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen, wie die Aortenklappenstenose, stellen eine der häufigsten Todesursachen dar. Die Pathogenese der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung (CAVD) ist komplex, und es gibt derzeit keine pharmakologischen Therapieoptionen, um den Krankheitsverlauf zu verlangsamen. Ziel dieser Arbeit war es, ein dreidimensionales Krankheitsmodell zu entwickeln, das die physiologischen Bedingungen der Aortenklappe nachbildet, um die Pathophysiologie der CAVD besser zu verstehen und potenzielle therapeutische Ansätze zu ermöglichen.

In dieser Arbeit wurde ein extrusionsbasiertes 3D-Bioprinting-Verfahren eingesetzt, um Gerüste aus Alginat-Gelatine-Hydrogelen mit valvulären Interstitialzellen (VIC) und verschiedenen Druckparametern herzustellen. Zusätzlich wurden alternative Hydrogel-Kompositionen wie dezellularisierte extrazelluläre Matrix (dECM) und künstliche ECM (aECM) getestet. Neben der Zellviabilität wurden auch die strukturelle Integrität und die Auswirkungen der Druckparameter, wie die Wahl der Dosiernadel, untersucht. Konische und zylindrische Nadeln wurden hinsichtlich ihrer Effekte auf den Scherstress und die Überlebensfähigkeit der VIC verglichen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Standardhydrogele aus Alginat und Gelatine, die in VIC-Kulturmedium (DMEM) aufgelöst wurden, die höchste Zellviabilität und Proliferation im Gegensatz zu standardmäßig genutzten kochsalzbasierten Hydrogelen aufwiesen, während die dECM-basierten Hydrogele eine schlechtere Zellüberlebensrate zeigten. Auch die Wahl der Dosiernadel spielte eine entscheidende Rolle: Zylindrische Nadeln führten zu besseren Zellüberlebensraten im Vergleich zu konischen Nadeln. Die Verwendung von Natriumcitrat zur kontrollierten Degradation des Alginats führte in höheren Konzentrationen zu einer verringerten Zellviabilität.

Diese Arbeit legt den Grundstein für die Entwicklung präziser 3D-Krankheitsmodelle der CAVD, die für die Erforschung ihrer Pathogenese und Therapie genutzt werden können. Zukünftige Studien sollten sich auf die Verbesserung der Hydrogelkomponenten und den Einsatz dynamischer Bioreaktoren konzentrieren, um die physiologischen Bedingungen besser zu simulieren. Zudem könnten vaskularisierte Strukturen durch den Einsatz von Koaxialdruckköpfen geschaffen werden, um die Nährstoffversorgung zu optimieren und die Modelle noch realistischer zu gestalten.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases, particularly aortic valve stenosis, are among the leading causes of mortality. The pathogenesis of calcific aortic valve disease (CAVD) is complex, and there are currently no pharmacological treatments to slow disease progression. This research aimed to develop a three-dimensional disease model that mimics the physiological conditions of the aortic valve, providing a better understanding of CAVD pathophysiology and facilitating potential therapeutic approaches.

In this study, an extrusion-based 3D bioprinting technique was used to fabricate scaffolds from alginate-gelatin hydrogels and valvular interstitial cells (VIC) with various printing parameters. Additionally, alternative hydrogel compositions, such as decellularized extracellular matrix (dECM) and artificial ECM (aECM), were tested. Besides cell viability, the structural integrity and the effects of printing parameters, such as needle selection, were investigated. Conical and cylindrical needles were compared in terms of their impact on shear stress and cell survival.

The results showed that standard alginate-gelatin hydrogels dissolved in VIC culture medium (DMEM) exhibited the highest cell viability and proliferation compared to standard saline-based hydrogels, while dECM-based hydrogels showed reduced VIC survival. Needle selection also played a crucial role: cylindrical needles resulted in better cell survival rates compared to conical needles. The use of sodium citrate for controlled alginate degradation led to decreased cell viability at higher concentrations.

This work provides the foundation for developing precise 3D disease models which can be used to study CAVD. Future studies should focus on improving hydrogel components and employing dynamic bioreactors to better simulate physiological conditions. Additionally, vascularized structures could be created using coaxial printheads to optimize nutrient supply and further enhance the realism of the models.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius	L	Layer
€	Euro	lat.	Latein
2D	Zweidimensional	LDH	Lactatdehydrogenase
3D	Dreidimensional	LDL	Low Density Lipoprotein
A.	Arteria	Lp(a)	Lipoprotein a
Abb.	Abbildung	LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
aECM	artifizielle extrazelluläre Matrix	M	Kontextabhängig: Mol oder Mittelwert
AM	Acetoxymethyl	mg	Milligramm
Aq. dest.	Destilliertes Wasser	min	Minute
BCA	Bicinchoninsäure	miRNA	Mikro-Ribonukleinsäure
BMP	Bone Morphogenetic Protein	ml	Milliliter
BNP	B-natriuretisches Peptid	ml ⁻¹	pro Milliliter
BSA	Kälberserumalbumin	mm/s	Millimeter pro Sekunde
bzw.	beziehungsweise	mm ²	Quadratmillimeter
Ca ²⁺	Zweiwertiges Calciumkation	mm ² /s	Quadratmillimeter pro Sekunde
CaCl ₂	Calciumchlorid	mmol	Millimol
CAVD	Calcific Aortic Valve Disease	MRT	Magnetresonanztomographie
CCK-8	Cell Counting Kit-8	MS	Microsoft
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	n	Anzahl
CT	Computertomographie	NaCi	Natriumcitrat
d	Tag	NaCl	Natriumchlorid
DCA	Natriumdesoxycholat	NaIO ₄	Natriummetaperiodat
dECM	dezellularisierte extrazelluläre Matrix	NaN ₃	Natriumazid
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine	NaOH	Natronlauge
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	NIH	National Institutes of Health
DNA	Desoxyribonukleinsäure	nm	Nanometer
DPP-4	Dipeptidylpeptidase-4	O	Einwertiges Sauerstoffanion
dt.	Deutsch	OP	Operation
ECM	Extrazelluläre Matrix	ox	oxidiert
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	p	Kontextabhängig: Passage, Druck oder präzise
Engl.	Englisch	P	Pattern
FCS	Fetales Kälberserum	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
G	Kontextabhängig: Gauge oder Gitter	PenStrep	Penicillin/Streptomycin
GAGs	Glykosaminoglykane	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
ges.	gesamt	rpm	Umdrehungen pro Minute
h	Stunde	s.	siehe
HCl	Salzsäure	SD	Standardabweichung
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A	SDS	Natriumdodecylcholat
hPa	Hektopascal	SE	Standardfehler
IL	Interleukin	sGAG	sulfatierte Glykosaminoglykane
k	konisch	STL	Stereolithographie
		TAVI	Transcatheter Aortic Valve Implantation

Tbl.....	Tabelle	V.	<i>Vena</i>
TEE.....	Transösophageale Echokardiographie	VEC.....	Valvuläre Endothelzellen
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i>	VIC.....	Valvuläre Interstitialzellen
T _H	Temperatur Hydrogel	Vv.	<i>Venae</i>
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α	W.....	Wabe
T _P	Temperatur Plattform	WST-8.....	Wasserlösliches Tatrazolumsalz 8
TTE.....	Transthorakale Echokardiographie	ZZ.....	ZigZag
UV.....	ultraviolett	α -SMA.....	<i>α-smooth muscle actin</i>
v.....	Geschwindigkeit	μ l.....	Mikroliter

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Aortenklappe (<i>Valva aortae</i>)	1
1.1.1	Makroskopische Anatomie	1
1.1.2	Mikroskopische Anatomie	2
1.1.3	Relevante Physiologie und Pathophysiologie	3
1.2	Die kalzifizierende Aortenklappenerkrankung (CAVD)	4
1.2.1	Epidemiologie, Diagnostik und Therapiemöglichkeiten	4
1.2.2	Rolle der valvulären Interstitialzellen (VIC) in der CAVD	5
1.2.3	Aktuelle Erkrankungsmodelle	8
1.3	3D-Druck und 3D-Bioprinting von Herzklappen	9
1.3.1	Druckprinzipien	10
1.3.2	Hydrogele	12
1.4	Ziele der Arbeit	14
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Primäre Zellkultur	15
2.2	Hydrogelherstellung	17
2.2.1	Hydrogelherstellung aus Alginat und Gelatine	17
2.2.2	Hydrogelherstellung aus dezellularisierter extrazellulärer Matrix	18
2.2.2.1	Präparation der Herzklappen	19
2.2.2.2	Dezellularisierung	19
2.2.2.3	Pulverisierung	20
2.2.2.4	Herstellung des Hydrogels	20
2.2.3	Hydrogelherstellung aus artifizieller extrazellulärer Matrix	21
2.2.4	Hinzufügen von VIC zu den Hydrogelen	21
2.3	3D-Druck und 3D-Bioprinting	22
2.3.1	Bearbeitung mit Visual Machines und Druck	23
2.3.2	Postprinting	24
2.3.2.1	Herstellen von Natriumcitratlösungen	25
2.4	Lichtmikroskopie	25
2.5	Laser-Scanning-Mikroskopie	25
2.6	Assays	26

2.6.1	<i>Life-/Dead-Assay</i>	26
2.6.2	CCK-8-Assay	27
2.6.3	LDH-Assay.....	27
2.6.4	BCA Protein Assay.....	28
2.7	Statistische Auswertung	28
2.8	Abbildungen	29
2.9	Materialien.....	29
2.9.1	Reagenzien und Chemikalien	29
2.9.2	Verbrauchsmaterialien.....	30
2.9.3	Geräte	31
2.9.4	Software.....	31
3	ERGEBNISSE.....	32
3.1	Druckparameter für Alginat/Gelatine-Hydrogele.....	32
3.2	Zellfreier Druck mit Alginat-Gelatine-Hydrogel	35
3.2.1	Einfluss unterschiedlicher Lösungsmittel im zellfreien Druck	35
3.2.2	Einfluss von Druckmustern auf Stabilität.....	37
3.3	Zelldruck mit VIC und Alginat-Gelatine-Hydrogel.....	40
3.3.1	Einfluss unterschiedlicher Lösungsmittel im Zelldruck.....	40
3.3.1.1	Lichtmikroskopische und makroskopische Auswertung.....	40
3.3.1.2	Relative Zellviabilität zu d21	43
3.3.1.3	Life-/Dead-Auswertung zu d21	44
3.3.2	Einfluss des Druckmusters bei Mehrschichtdrucken auf die Zellviabilität....	46
3.3.3	Einfluss der Druckerspitzen auf die Zellviabilität.....	48
3.3.4	Einfluss von Natriumcitrat auf die Zellviabilität.....	49
3.4	Vergleich von Zelldrucken mit VIC in dezellularisierter ECM und artifizieller ECM zum Standardhydrogel.....	53
4	DISKUSSION	58
4.1	Schlussfolgerungen.....	70
5	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	72
6.	ANHANG.....	79
6.1	Makro Life-/Dead-Assay.....	79

1 EINLEITUNG

1.1 Die Aortenklappe (*Valva aortae*)

1.1.1 Makroskopische Anatomie

Die Aortenklappe befindet sich in dem mit der Gefäßwand nach außen gewölbtem *Bulbus aortae* zwischen der linken Kammer und der ascendierenden Aorta. Die drei halbmondförmigen Taschen befinden sich rechts, links sowie dorsal und sind namensgebend (dt.: Taschenklappen; lat.: *Valvae semilunares*). Die drei Taschen besitzen einen freien Rand, die *Lunula valvarum semilunarium*, welche in der Mitte zu den *Noduli valvarum semilunarium* verdickt sind. Bei Klappenschluss bilden sie die *Commissurae valvarum semilunarium* und dichten das Lumen ab. Von der rechten und linken Tasche gehen in dem *Sinus aortae* die linke und rechte Koronararterie ab. Die Pulmonalklappen haben eine identische Form. Beide, Pulmonal- und Aortenklappen, unterscheiden sich vom Typus der Segelklappen (*Valvae cuspidales*), welche jeweils zwischen den Vorhöfen und Kammern lokalisiert sind (Benninghoff & Drenckhahn, 2008). Eine anatomische kongenitale Anomalie stellt bei 1 % bis 2 % der Bevölkerung die zweitaschige, bikuspidale, Aortenklappe dar (Braverman et al., 2005).

ABBILDUNG 1: MAKROANATOMIE DES HERZENS (SCHEMATISCH)

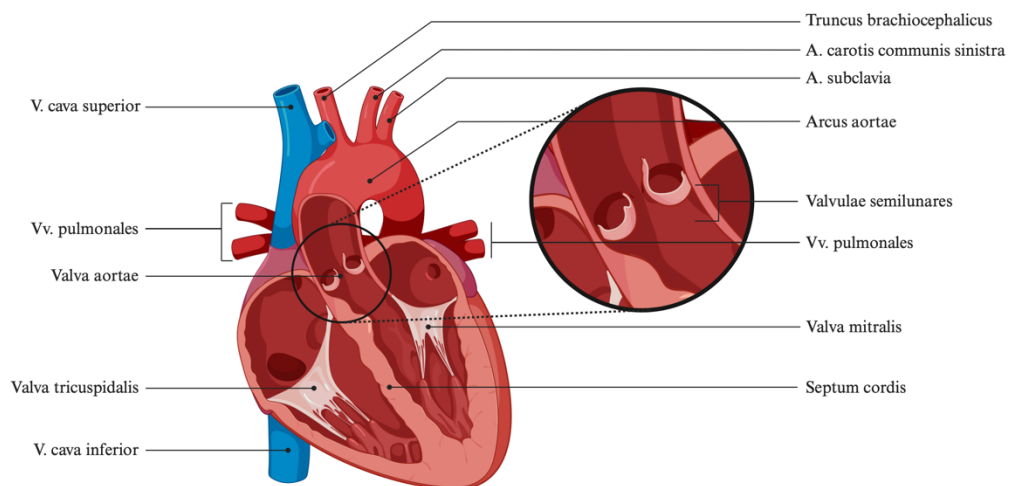


Abb. 1: Dargestellt ist ein schematischer Frontalschnitt des menschlichen Herzens mit Vergrößerung der in dieser Arbeit behandelten Aortenklappe. Abkürzungen: *V.* – *Vena* bzw. *Vv.* – *Venae*. *A.* – *Arteria*.

Befestigt ist die Aortenklappe im Herzskelett, einer Faserplatte aus straffem kollagenem Bindegewebe. Dort sind auch die restlichen Herzklappen in gleicher Weise befestigt, so dass von der sogenannten Ventilebene gesprochen wird. Im Kapitel 1.1.3 wird die entscheidende Rolle der Ventilebene für den Blutfluss erläutert. Zudem hat das Herzskelett eine wichtige elektrophysiologische Eigenschaft. Sie entkoppelt den Stromkreis zwischen den Vorhöfen und den Herzkammern und lässt allein das His-Bündel als elektrische Kopplung durch das *Trigonum fibrosum dextrum* zu (Aumüller, 2017).

1.1.2 Mikroskopische Anatomie

Die Aortenklappen leiten sich, wie auch die restlichen Herzklappen, von dem Endokard ab, welches auch die das Herz einkleidende Schicht ist. Dieses besteht primär aus Endothel und kollagenreichem Bindegewebe mit elastischen Fasern. Blutgefäße oder Muskulatur sind nicht vorhanden (Welsch et al., 2014). Die vorherrschenden Zellgruppen sind somit zum einen die valvulären Endothelzellen (VEC) sowie die valvulären Interstitialzellen (VIC). Während der Embryogenese migrieren die VEC in das Innere der Herzklappe und werden über Endothel-Mesenchym-Transitionsprozesse zu VIC (Butcher & Markwald, 2007). Die Herzklappen sind im Grunde gleich aufgebaut. Speziell bei der Aortenklappe sind beide Seiten mit Endothel ausgekleidet, wozwischen sich Bindegewebe befindet. Dieses wird in eine *Lamina fibrosa*, eine *Lamina spongiosa* und *Lamina ventricularis* unterteilt. Die Fibrosa besteht aus straffem kollagenem Bindegewebe und ist mit dem Herzskelett verbunden. Die Spongiosa besteht aus lockerem Bindegewebe mit hohem Gehalt an Hyaluronan und Proteoglykanen. Die *Lamina ventricularis* enthält einen hohen Anteil an elastischen Fasern (Misfeld & Sievers, 2007). Zudem ist die Lage der Bindegewebsschichten nicht zufällig. Die Spongiosa ist mit der *Lamina ventricularis* auf die den Scherkräften des Blutstroms zugewandten Seite. Bei der Aortenklappe also auf der Ventrikelseite. Die Fibrosa ist auf der gefäßzugewandten Seite (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019).

ABBILDUNG 2: MIKROANATOMIE DES HERZENS (SCHEMATISCH)

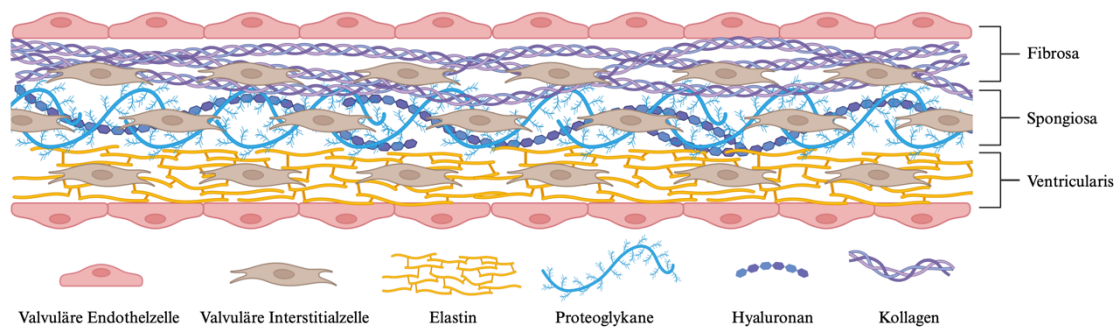


Abb. 2: Abgebildet ist eine schematische Darstellung der Mikroanatomie der menschlichen Aortenklappe mit den drei Schichten: Der Fibrosa, der Spongiosa und der Ventricularis. Jede Schicht hat eine distinkte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix. Modifiziert nach Rajamannan et al. (2011).

1.1.3 Relevante Physiologie und Pathophysiologie

Herzklappen fungieren als Ventile und steuern den Blutfluss im Kreislauf. Während der Systole sind die Segelklappen geschlossen und die Taschenklappen geöffnet, in der Diastole umgekehrt. Der Ventilebenenmechanismus unterstützt den Blutstrom durch Sog- und Füllmechanismen der Vorhöfe und Kammern. Die Aortenklappe verhindert während der Diastole den Rückstrom und ermöglicht die Koronarperfusion (Pape et al., 2019).

Klappenvitien werden in Insuffizienz und Stenose unterteilt. Bei einer Aortenklappeninsuffizienz führt eine Schlussunfähigkeit zu Regurgitation, Volumenbelastung und langfristig zur Herzinsuffizienz (Pape et al., 2019). Ursachen sind akute (Endokarditis, Aortendissektion) oder chronische Prozesse (bikuspide Aortenklappe, Degeneration), mit einer Prävalenz von 5 % (Akinseye et al., 2018).

Die Aortenklappenstenose betrifft bis zu 10 % der über 80-Jährigen und resultiert aus einer Verengung des Ausflusstrakts, meist durch Kalzifikation oder eine bikuspidale Klappe. Dies führt zu einer Druckbelastung mit konzentrischer Hypertrophie, die bei fortschreitender Erkrankung in eine Herzinsuffizienz übergehen kann (Pape et al., 2019). Die rheumatische Genese ist in industrialisierten Ländern inzwischen selten (Joseph et al., 2017).

1.2 Die kalzifizierende Aortenklappenerkrankung (CAVD)

Der klinische Hintergrund dieser Arbeit ist die kalzifizierende Aortenklappenerkrankung (Eng.: *calcific aortic valve disease*, CAVD). Die CAVD ist eine aktive, multifaktorielle und komplexe Erkrankung. Sie hat anfangs Ähnlichkeit zur Atherosklerose. Durch Endothelschädigungen kommt es zur Auslösung von biologischen Kaskaden, welche zu einer Inflammation mit hohem oxidativem Stress führen (Di Vito et al., 2021; Rutkovskiy et al., 2017). Makrophagen speichern die durch die Endothelschädigungen eingetretenen und durch den oxidativen Stress veränderten Lipide ein und verändern sich insgesamt wie bei der Atherosklerose zu sogenannten Schaumzellen. Durch Akkumulation dieser Schaumzellen kommt es zur Entwicklung von Plaques. Dies führt zur Verdickung und Steifigkeit der Aortenklappe, welche in einer sukzessiven obstruktiven Funktionseinschränkung endet, der Aortenklappenstenose. Symptomatisch zeigt sich die Aortenklappenstenose erst nach langer asymptomatischer Phase durch Belastungsdyspnoe, belastungsabhängige Angina pectoris und Synkopen (Herold, 2020). Relevanz gewinnt die CAVD durch ihre Prävalenz in der älter werdenden Bevölkerung sowie dem Mangel an pharmakologischen Therapiemöglichkeiten. Ohne Therapie hat eine symptomatische Aortenklappenstenose ein schlechtes *Outcome*. Mit Grund für diesen Zustand ist die noch nicht in Gänze verstandene Pathogenese. Es sind somit neue Erkrankungsmodelle notwendig, um die Prozesse in der Aortenklappe zu verstehen und zu den chirurgischen/interventionellen Möglichkeiten weitere adäquate Therapieansätze zu schaffen.

1.2.1 Epidemiologie, Diagnostik und Therapiemöglichkeiten

Die CAVD ist die häufigste Ursache therapiebedürftiger Herzklappenerkrankungen und nach Hypertonie und KHK die dritthäufigste kardiovaskuläre Pathologie (Lindman et al., 2016). Ihre Prävalenz wird sich in den nächsten 30 Jahren voraussichtlich verdreifachen. Hauptrisikofaktoren sind erhöhter systolischer Blutdruck, kochsalzreiche Ernährung, Bleiexposition sowie erhöhte Lipoprotein(a)- und LDL-Spiegel, bikuspidale Aortenklappe, Rauchen, Diabetes mellitus Typ II, metabolisches Syndrom, Störungen im Calcium-/Phosphat-Stoffwechsel und chronische Nierenerkrankungen (Danielsen et al., 2014; Yi et al., 2021) (siehe Abb. 3).

Klinisch unterscheidet man zwischen subklinischer Aortenklappensklerose und obstruktiver Aortenklappenstenose (siehe Abb. 3). Letztere entwickelt sich in ca. 2 % der Fälle

pro Jahr aus einer Sklerose. Ohne Therapie beträgt das Überleben bei symptomatischer Aortenstenose weniger als zwei Jahre (Clark et al., 2012; Coffey et al., 2014).

Die Schwere der Aortenstenose wird anhand des systolischen Druckgradienten, der Klappenöffnungsfläche und der maximalen Flussgeschwindigkeit bestimmt (Baumgartner et al., 2017). Biomarker könnten künftig zur Einschätzung von Stadium und Progression beitragen.

Der Aortenklappenersatz ist die Standardtherapie und kann chirurgisch oder interventionell (TAVI) erfolgen. Die Wahl zwischen biologischer und mechanischer Klappe hängt von Alter und Antikoagulationsbedarf ab. Mechanische Klappen sind langlebig, erfordern aber eine lebenslange Antikoagulation, während biologische Klappen keine Antikoagulation benötigen, jedoch nach 10–15 Jahren degenerieren. Der interventionelle Ansatz wird bei hohem perioperativem Risiko bevorzugt (Baumgartner et al., 2017; Nalluri et al., 2018).

Eine pharmakologische Therapie zur Verzögerung der CAVD-Progression existiert nicht. Statine zeigen im späten Stadium keine Wirkung (Chan et al., 2010). Hinweise deuten darauf hin, dass Statine in frühen Stadien über den Adenosinmetabolismus einen Effekt haben könnten (Kutryb-Zajac et al., 2020). Evogliptin, ein DPP-4-Inhibitor, zeigte positive Ergebnisse im Tiermodell, dies muss aber weiter untersucht werden.

1.2.2 Rolle der valvulären Interstitialzellen (VIC) in der CAVD

Bei der CAVD spielen im Unterschied zur Atherosklerose zwei wichtige Faktoren eine Rolle. Zum einen die unterschiedlichen Scherkräfte. Diese unterliegen bei der Aortenklappe größeren Schwankungen, bei der Atherosklerose ist im Allgemeinen eine laminare Strömung vorhanden (Lerman et al., 2015). Zum anderen die distinkten Zellen der Aortenklappe. Die VIC sind physiologisch in einem ruhenden Zustand, der sich bei pathologischen Verhältnissen wie der oben beschriebenen chronischen Entzündungsreaktion über Mediatoren in einen aktiven Zustand ändern kann. TGF- β , TNF- α und Interleukin 2 sind als wichtige Mediatoren identifiziert worden (Jenke et al., 2020; Lerman et al., 2015). Im aktiven Zustand differenzieren sich die VIC zu Myofibroblasten und verändern das Mikromilieu durch Umbau der extrazellulären Matrix innerhalb der entstandenen Plaques. Die veränderten VIC können durch die Expression von *α -smooth muscle actin* (α -SMA) identifiziert werden. Neben der Fibroblasten-Myofibroblasten-Transformation

sind VIC in der Lage einen osteoblastenähnlichen Phänotyp anzunehmen. Dabei spielt der Wnt/ β -Catenin-Signalweg, welcher über *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) induziert wird, eine entscheidende Rolle. Insgesamt kommt es zu einer Calciumeinlagerung und Verknöcherung mit folgender Verdickung der Plaques und der Aortenklappe insgesamt, was ergo zu einer Reduktion der Öffnungs- und Schließkapazität der Klappen und den damit im Kapitel 1.1.3 erörterten veränderten Flusseigenschaften führt (Di Vito et al., 2021). Die VIC selbst interagieren mit den VEC, sodass diese mitaktiviert werden. Ein weiteres typisches Zeichen der CAVD ist die einerseits durch inflammatorische Mediatoren sowie andererseits durch die Verdickung folgende Hypoxie ausgelöste Neoangiogenese (Donato et al., 2014; Lindman et al., 2016). Zudem gewinnt die Erforschung von regulierender miRNA in jüngerer Zeit zunehmend an Relevanz, da sie potenzielle Angriffspunkte für zielgenaue Therapien darstellen (Bian et al., 2021; Di Vito et al., 2021; Katsi et al., 2021). Auch der Einfluss des Mikrobioms entweder über direkte schädigende Einflüsse von Mikroorganismen oder über den Weg der adaptiven Immunantwort gewinnt an Relevanz (Alushi et al., 2020).

ABBILDUNG 3: MAKRO- UND MIKROSKOPISCHE PATHOGENESE DER AORTENKLAPPENERKRANKUNG

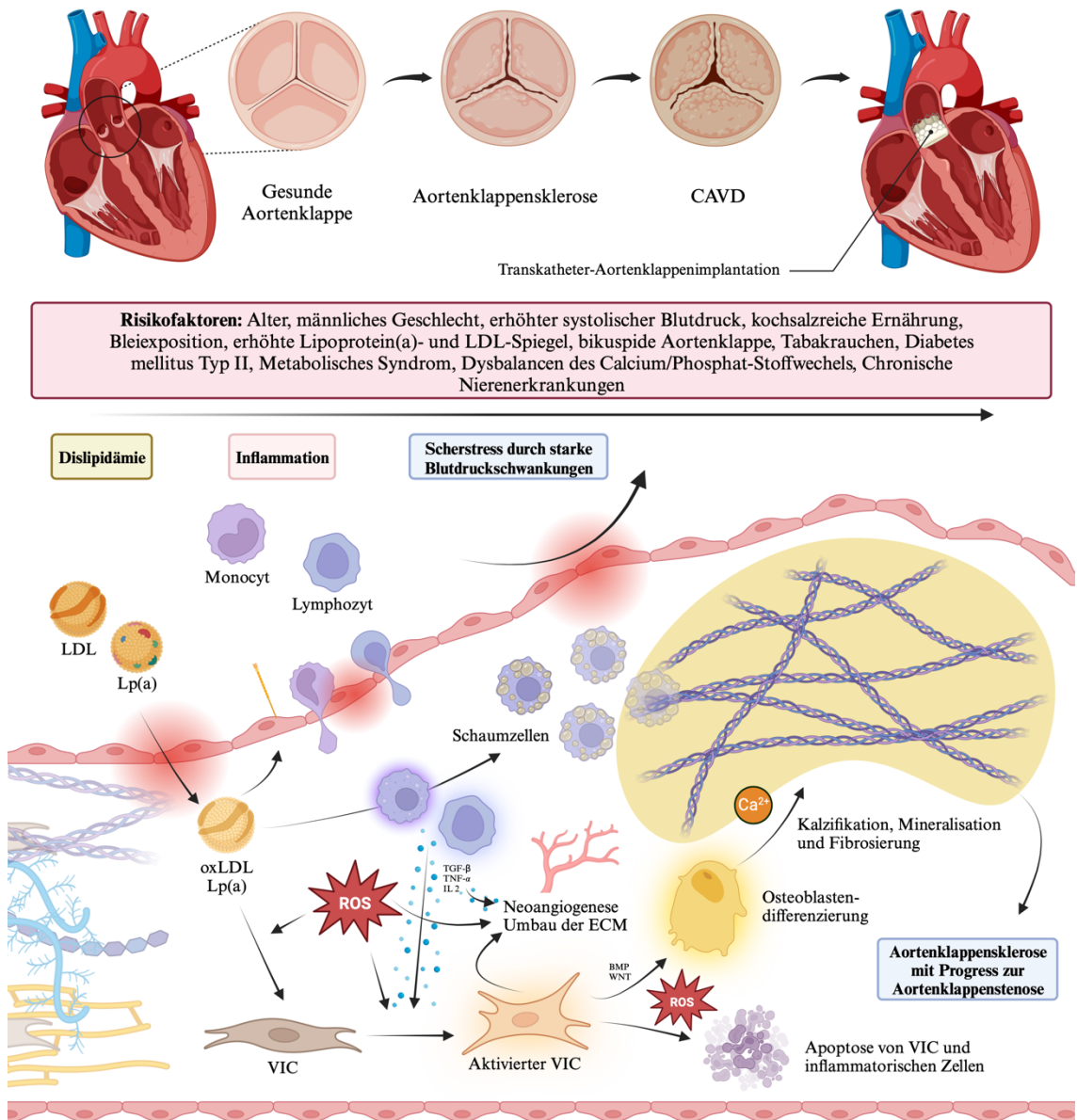


Abb. 3: Die Abbildung zeigt oben die schematischen makroskopischen Veränderungen der CAVD im zeitlichen Verlauf. Mit den aufgeführten Risikofaktoren besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit eine Aortenklappensklerose und nachfolgend eine kalzifizierende Aortenklappenerkrankung zu entwickeln. Es kommt durch Endothelschädigungen und einer Dislipidämie zum Einstrom von LDL, welche durch reaktive Sauerstoffspezies oxidiert werden. In der Folge kommt es zum Einstrom von Immunzellen, welche zusammen mit den reaktiven Sauerstoffspezies zur Aktivierung von ruhenden VIC sowie zum Umbau der Extrazellulären Matrix führen. In der Folge kommt es zur Bildung von Schaumzellen und beginnenden Plaques, wobei es durch proosteogene Differenzierung der VIC zur Kalziumeinlagerung und Mineralisation der Plaques kommt. Insgesamt führt dies zur Versteifung der Aortenklappe und Funktionseinschränkungen, woraus klinisch im Verlauf eine Aortenklappenstenose entsteht. Modifiziert nach Tanase et al. (2022) und

Beckmann et al. (2010). Abkürzungen: CAVD – Kalzifizierende Aortenklappenerkrankung; VIC – Valvuläre Interstitialzelle; (ox) LDL – (oxidiertes) Lipoprotein niedriger Dichte; Lp(a) – Lipoprotein a; ROS – Reaktive Sauerstoffspezies; ECM – Extrazelluläre Matrix; TGF - *transforming growth factor*; TNF – *tumor necrosis factor*; IL – Interleukin; BMP - *Bone Morphogenetic Protein*; WNT - *Wingless/Integrated-Signalweg*; Ca²⁺- Kalziumchlorid

1.2.3 Aktuelle Erkrankungsmodelle

Bei der Erforschung der kalzifizierten Aortenklappenerkrankung (CAVD) werden häufig Krankheitsmodelle verwendet, um die zugrundeliegenden Mechanismen besser zu verstehen, potenzielle Therapien zu testen und präventive Maßnahmen zu untersuchen. Es werden mehrere Arten von Krankheitsmodellen eingesetzt, welche sich klassisch in *in vitro* - und *in vivo* -Modelle einteilen lassen.

Werden nun die *in vitro* Erkrankungsmodelle betrachtet, gibt es verschiedene Quellen für die benötigten Zellen. Es werden tierische/xenogene (z.B. Schwein, Schaaf, Ratte) von humanen Zelllinien unterschieden, welche sich in den Aspekten Beschaffung und klinische Aussagekraft konträr zueinander verhalten (Rutkovskiy et al., 2017). Weiterhin gibt es unterschiedliche Kulturmöglichkeiten, nämlich der zweidimensionalen und der dreidimensionalen Kultur. Letzteres kann weiter in der Verwendung der exzidierten Herzklappe im Ganzen oder der vorherigen Isolation der benötigten Zelllinie und der anschließenden dreidimensionalen Kultur unterschieden werden (Weber et al., 2021). Doch mangelt es bei zweidimensionalen Modellen an der mikroanatomischen Anordnung und schließlich der Interaktion zwischen den Zellen untereinander und mit dem Mikromilieu (Bowler & Merryman, 2015). Eine 3D-Kultur bietet somit eine zunehmende Komplexität, welche sich unterschiedlich gestalten kann. Sowohl Verfahren in denen die Zellen zusammen mit einer stabilisierenden Matrix wie beispielsweise Kollagen, in eine Form gegossen werden, als auch der 3D-Druck stehen zur Verfügung (Hjortnaes et al., 2016; Nehrenheim et al., 2019). Vom Druck verspricht man sich den Vorteil der präzisen Platzierung der Zellen im dreidimensionalen Raum, sodass anatomische Verhältnisse rekonstruiert werden können (Haycock, 2011). 3D-Kulturen sind nachgewiesener Weise näher an *in-vivo*-Kulturen als 2D-Kulturen (Ravi et al., 2015). Andererseits verhalten sich VIC in den unterschiedlichen Dimensionalitäten distinkt, sodass teils unterschiedliche Phänotypen entstehen. Dies unterstreicht die Wichtigkeit die unterschiedlichen Dimensionen und Kulturformen in der Forschung mit einzubeziehen (Mabry et al., 2016).

Mit einer Co-Kultur aus VIC und VEC, sowie bezogen auf die 3D-Kultur das Verwenden von extrazellulären Matrixbestandteilen, kann die Komplexität weiter erweitert werden (Bowler & Merryman, 2015; Immohr, Teichert, et al., 2023).

Höhere Aussagekraft haben schlussendlich *in-vivo*-Modelle, bei denen unterschiedliche Tierspezies in Frage kommen. Für die experimentelle Forschung, die sich beispielsweise auf Entwicklungsfehlbildungen konzentrieren, werden in der Regel kleine Tiermodelle verwendet (z.B. Ratte, Maus, Kaninchen), die für *in-vivo*-Bildgebung leicht zugänglich sind. Neue Geräte für den Ersatz und die Reparatur kranker Herzklappen werden hingegen häufig in großen Tieren verwendet, deren Herzgröße und Anatomie der des Menschen sehr ähnlich sind (z.B. Schwein, Schaaf) (Kheradvar et al., 2017).

Ein detailgetreues Erkrankungsmodell der Realität, in diesem Falle der Aortenklappe, könnte die Erforschung der immer relevanter werdenden CAVD voranbringen und Engpässen von gesundem, humanem Biomaterial entgegenwirken.

1.3 3D-Druck und 3D-Bioprinting von Herzklappen

Das Anfertigen von dreidimensionalen, patientenindividuellen Herzstrukturen aus MRT-CT- oder bereits TTE/TEE-Untersuchungen zur Veranschaulichung der bestehenden Herzpathologie wird zunehmend in der kardiovaskulären klinischen Medizin eingesetzt (Giannopoulos et al., 2016). Sie konzentriert sich jedoch hauptsächlich auf die Herstellung künstlicher Modelle, zum Beispiel kongenitaler Herzanomalien oder Herzklappendefekte, für die Veranschaulichung in der Arzt-Patienten-Kommunikation, der theoretischen und praktischen Ausbildung von interessierten Medizinstudierenden beziehungsweise klinisch tätigen Ärztinnen und Ärzten als auch zur individuellen Planung operativer und interventioneller Verfahren (Hadeed et al., 2018; Townsend & Pietila, 2018). In Bezug auf den Aortenklappenersatz kann letzteres die Entscheidungsfindung operativer versus interventionelle Verfahren durch bessere Veranschaulichung der individuellen Anatomie verbessern und so das Therapieoutcome einerseits durch eine bessere Planung, andererseits durch eine bessere OP-Vorbereitung mit Visualisierung der einzelnen OP-Schritte, insgesamt gesteigert werden (Fan et al., 2019; Ganguli et al., 2018).

Im Gegensatz dazu werden beim 3D-Bioprinting biokompatible Drucke hergestellt durch Hinzufügen von lebenden Zellen zu der Drucktinte, die beim 3D-Bioprinting auch *bioink* oder Hydrogel genannt wird. Ziel sind der Druck von einfachen 3D-Kulturen bis zum

Druck von komplexeren Herzteilstrukturen hingehend bis zum Druck des Herzens in vollem Umfang (Noor et al., 2019). Dabei sind die Intentionen dahinter different. Einerseits kann es dazu dienen eine geeignete Kultur für Erkrankungsmodelle zu etablieren. In der aortalen Herzklappenforschung wurden bereits 3D-Bioprinting-VIC-Modelle beschrieben, die sowohl eine hohe Zellviabilität, gute Proliferationseigenschaften und eine Beibehaltung des Phänotyps in der Kultur gezeigt haben als auch bestimmte Aspekte der Pathogenese reproduzieren konnten (Duan et al., 2013; van der Valk et al., 2018).

Andererseits werden 3D-Biodrucke mit der Intention entwickelt diese später im Menschen als Ersatz für bestimmte Pathologien einzusetzen. Dabei sind beispielsweise vaskularisierte Herzpatches zum Ersatz beim Zustand nach Absterben oder irreversiblen Funktionsschädigungen von Herzmuskelgewebe (Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz) oder der Ersatz der Aortenklappe in der Entwicklung (Zhang et al., 2017). In Bezug auf den Aortenklappenersatz sind bis heute noch keine dreidimensional gedruckten Aortenklappen am Menschen getestet worden. Die in der Herstellung aufkommenden Herausforderungen umfassen verschiedene Aspekte, darunter die Biokompatibilität, mechanische Eigenschaften, die langfristige Leistung des Ersatzes, die immensen Kosten und zuletzt strenge behördliche Genehmigungen (Bhandari et al., 2023).

1.3.1 Druckprinzipien

Es existieren unterschiedliche Möglichkeiten des 3D-Bioprintings, was das Druckprinzip und die Wahl des Hydrogels anbelangen. In dieser Arbeit wurde das extrusionsbasierte Prinzip verwendet, wobei das Hydrogel mittels pneumatischen Druckes aus einer Spritze kontrolliert extrudiert wird. Das Prinzip ist schematisch in Abbildung 5 in Kapitel 2 veranschaulicht. Beim extrusionsbasierten Prinzip unterscheidet man neben dem pneumatischen Prinzip noch den Kolben- und den Schraubenmechanismus. Ning et al. (2020) zeigte jedoch, dass das pneumatische extrusionsbasierte Verfahren den anderen beiden Verfahren aufgrund des geringer ausfallenden Zellschadens überlegen ist. Neben dem extrusionsbasierten Verfahren existieren noch zahlreiche weitere Verfahren (Fused Deposition Modeling, Stereolithografie, Inkjet-basiertes Bioprinting, Laser-basiertes Bioprinting, Vat-Polymerisation, etc.), wobei aufgrund der fehlenden Relevanz für diese Arbeit lediglich auf die Literatur verwiesen wird (Vanaei et al., 2021).

Entscheidend für einen idealen extrusionsbasierten Druck ist die Einstellung von vier Parametern am Drucker selbst, welche sich jeweils gegenseitig positiv oder negativ beeinflussen: Druck, Geschwindigkeit sowie die Temperatur sowohl des Hydrogels als auch der Druckplattform. Zielgrößen sind die Druckfähigkeit sowie die Präzision der gedruckten Konstrukte. Beim Bioprinting kommt der Zellstress bzw. die Scherkräfte auf die Zellen hinzu. Die Druckfähigkeit beschreibt die Fähigkeit reproduzierbare dreidimensionale Konstrukte aus Hydrogelen zu drucken. Dabei spielen Faktoren wie Viskosität, Fließverhalten und die Fähigkeit des Materials, die gewünschte Form beizubehalten eine wichtige Rolle, welche durch die oben genannten vier Parameter beeinflusst werden. Die Präzision bezieht sich auf die Genauigkeit, mit der die gedruckte Struktur den geplanten Maßen und dem Design entspricht (Naghieh & Chen, 2021). Eine schlechte Druckfähigkeit kann zu einer verringerten Präzision führen, da instabile Hydrogele oder ungünstige Druckparameter die Formtreue der Struktur beeinträchtigen. Eine schlechte Druckfähigkeit hat aber nicht zwangsläufig eine schlechte Präzision zur Folge. Beispielsweise kann ein kaltes Hydrogel mit einer schlechten Druckfähigkeit mit hohem Druck trotzdem präzise Ergebnisse erzielen, jedoch mit hohen Scherkräften auf die Zellen. Die genauen Zusammenhänge werden in Kapitel 3.1 erläutert (s. Abb. 10) und in Kapitel 4 mit aktueller Literatur verglichen.

Entscheidend ist zudem die Auswahl der Dosiernadel, also die Form der Applikation des Hydrogels auf die Zellkulturplattform. Die Dosiernadeln gibt es in unterschiedlichen Formen und Größen. Die in dieser Arbeit verwendeten Dosiernadeln sind in Abbildung 7 dargestellt. Die Dosiernadel hat einen wesentlichen Einfluss auf die Druckparameter. Die Druckparameter haben wiederum Einfluss auf die Scherkräfte auf die Zellen während des Druckvorganges. Mit abnehmendem Dosiernadeldurchmesser steigen die Scherkräfte auf die Zellen (Blaeser et al., 2016). Weiterhin sollten konische Spitzen geringere Scherkräfte auf die Zellen auswirken als rein zylindrische Präzisionsspitzen, da die Scherkräfte auf die Zellen bei den konischen Dosiernadeln mit abnehmendem Durchmesser nur graduell auf die Zellen ausgeübt wird, bei den zylindrischen akut auf Höhe des Dosiernadeleingangs. Da es dazu wenige Ergebnisse in der Literatur gab, war die Auswirkung der beiden Dosiernadelformen zu untersuchen. Letztlich ergibt sich ein notwendiger Kompromiss zwischen Druckfähigkeit, Präzision und hoher Zellviabilität durch Anpassen der Druckparameter und der Wahl einer Dosiernadel. Bei Modifikation eines Parameters müssen

zwangsläufig auch weitere Parameter geändert werden, um ein ideales Ergebnis zu erzielen.

1.3.2 Hydrogele

Weiterhin existieren unterschiedliche Möglichkeiten der Wahl des Hydrogels. Die in der Literatur häufig verwendeten Hydrogele bestehen aus Gelatine und Alginat (Duan et al., 2013; Łabowska et al., 2021; Wu et al., 2016). Gelatine entsteht durch Denaturierung von Kollagen und kann durch Hydrolyse aus Tierknochen, Sehnen oder Häuten gewonnen werden. Gelatine ist thermosensitiv und bildet bei niedrigen Temperaturen ein Hydrogel. Als natürliches Polymer wird Gelatine aufgrund ihrer Biokompatibilität, ihrer biologischen Abbaubarkeit, ihrer geringen Antigenität, ihrer Abwesenheit von schädlichen Nebenprodukten, ihrer einfachen Verarbeitung und geringen Produktkosten häufig in biomedizinischen Anwendungen eingesetzt (Gungor-Ozkerim et al., 2018). Da Gelatine jedoch unter Inkubationsbedingungen nicht stabil ist, müssen der Gelatine entweder photopolymerisierbare Methacryloylgruppen, die eine kovalente Vernetzung durch UV-Licht nach dem Bioprinting-Prozess ermöglichen, oder ein weiteres stabilitätsstiftendes Agens hinzugegeben werden (Łabowska et al., 2021). Alginat wird aus der Braunalge gewonnen und ist den Glykosaminoglykanen in der extrazellulären Matrix des menschlichen Körpers ähnlich. Wie bei der Gelatine wird es wegen seiner Biokompatibilität, seiner geringen Zytotoxizität, der Gelierfähigkeit und den geringen Produktkosten gerne verwendet. Die Gelierung von Alginat erfolgt dabei in der Gegenwart von zweiwertigen Kationen, wie beispielsweise Ca^{2+} , durch Überbrückung von Polymerketten, was zu einer ionischen Vernetzung und Festigung führt, wobei die Viskosität des späteren Hydrogels konzentrationsabhängig ist (Gungor-Ozkerim et al., 2018). Die Entfernung der ionisch vernetzten Alginatstrukturen aus einer dreidimensional gedruckten Struktur kann durch Austauschreaktionen mit einwertigen Anionen im umgebenden Medium kontrolliert aufgelöst werden (Wu et al., 2016). In der Kombination von Alginat und Gelatine in Hydrogelen beeinflusst Gelatine primär die Druckfähigkeit, Alginat hingegen die mechanische Stabilität des gedruckten Konstrukts.

Nichtsdestotrotz bestehen Herausforderungen des vorgestellten Hydrogels aus Alginat und Gelatine, aber auch anderer herkömmlicher Hydrogele, aufgrund der begrenzten Zell-Hydrogel-Wechselwirkungen und die unzulängliche Nachbildung der Komplexität der natürlichen extrazellulären Matrix (Gungor-Ozkerim et al., 2018). Dabei gewinnen

Hydrogele aus dezellularisierter extrazellulärer Matrix immer weiter an Popularität, da sie in der Theorie die optimale Mikroumgebung für das 3D-Gewebewachstum schaffen (Pati et al., 2014). Die extrazelluläre Matrix ist für jeden Gewebetypen einzigartig und kann durch Dezellularisierung zur Verhinderung einer Immunantwort für den gewünschten Gewebetypen erreicht werden, ebenso für die Aortenklappe (Nehrenheim et al., 2019). Allerdings ist dezellularisierte extrazelluläre Matrix aufgrund ihrer Geliereigenschaften im Grunde genommen, spezifisch für den in dieser Arbeit verwendeten 3D-Bioprinter, nicht druckkompatibel, sodass druckfördernde Agentien hinzugegeben werden müssen (Zhang et al., 2023). Oropeza et al. (2022) zeigten bereits die Möglichkeit eines erfolgreichen 3D-Biodruckes mit dezellularisierter extrazellulärer Matrix aus aortalen Schweineherzklappen mit zuversichtlichen Ergebnissen hinsichtlich der erreichten Zellviabilität.

ABBILDUNG 4: CROSSLINKING VON ALGINAT MITTELS CALIUMCHLORID SOWIE AUFLÖSUNG MITTELS EINWÄRTIGER ANIONEN

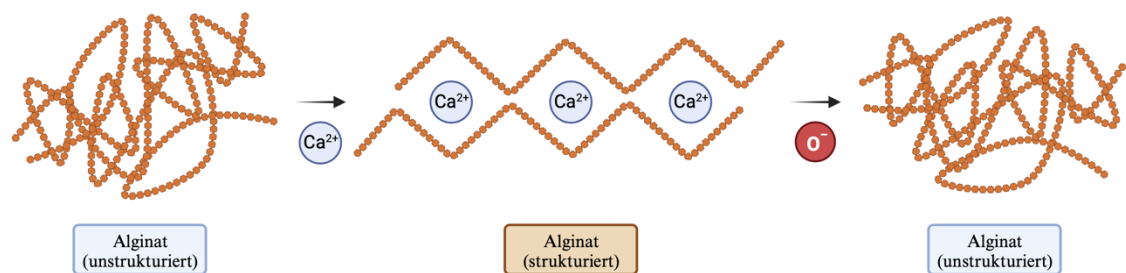


Abb. 4: Die Proteinstruktur des Alginats liegt im Druckzustand ungeordnet vor. Durch Zugabe von Calciumchlorid entsteht eine geordnete Bindung der einzelnen Polysaccharide, was eine Festigkeit bei 37° C verleiht. Ohne *Crosslinking* würde sich der Druck im Inkubator verflüssigen. Durch Zugabe einwertiger Anionen, wie beispielsweise in Natriumcitrat vorhanden, kommt es zu Austauschreaktionen, wodurch das Alginat wieder unstrukturiert vorliegt und seine Festigkeit verliert. Abkürzungen: Ca^{2+} - Zweiwertiges Calciumkation; O^- - Einwertiges Sauerstoffanion.

1.4 Ziele der Arbeit

Nach Erläuterung des vorklinischen und klinischen Hintergrundes sowie dem Ansatz des 3D-Druckes bzw. des 3D-Bioprintings, sollen in dieser Arbeit klar definierte Parameter untersucht werden. Die Zellen sind während des Druckprozesses einem schädlichen Scherstress, welcher durch den pneumatischen Druck während des Druckprozesses, der Hydrogelviskosität und des Dosiernadeldurchmessers beeinflusst wird, sowie Temperaturunterschieden ausgesetzt, was die Lebensfähigkeit der Zellen innerhalb des gedruckten Gerüsts akut beim Druckprozess aber auch langfristig die Proliferationseigenschaften verringern kann (Blaeser et al., 2016; Ning et al., 2020). Ziel dieser Arbeit war eine systematische Untersuchung des Einflusses von Hydrogel- und Druckeigenschaften auf die Zellviabilität von valvulären Interstitialzellen. Zu diesen Variablen gehören zum einen die Komposition des Hydrogels, die verwendeten Druckparameter bei dem Druck, die verwendeten Dosiernadeln, das benutzte Druckmuster und die Höhe der Schichtung der gefertigten Objekte. Weiterhin soll der Einfluss bei einem graduellen Abbau des Hydrogels mit Natriumcitrat auf das Überleben der Zellen beurteilt werden. Zur Beurteilung wurden neben lichtmikroskopischen Aufnahmen unterschiedliche Assays verwendet, die entweder die Zytotoxizität, die relative Viabilität oder eine Life-/Dead-Ratio als Messwert ausgaben.

Das Standardhydrogel aus Alginat und Gelatine wird am Ende mit zwei alternativen Hydrogelen verglichen werden. Beide Alternativen sollen durch Nachahmung der extrazellulären Matrix ein realistischeres Milieu bieten. Zum einen wurde dezellularisierte extrazelluläre Matrix, zum anderen artifizielle extrazelluläre Matrix verwendet. Die artifizielle extrazelluläre Matrix wurde aus Kollagen I hergestellt. Auch hier wurden neben lichtmikroskopischen Aufnahmen die unterschiedlichen Assays zur Beurteilung verwendet.

durchgeführt. Für die Isolation von VIC wurde das Perikard mit dem anhängenden epikardialen Fettgewebe entfernt. Anschließend wurde sowohl die *Aorta ascendens* und die *Arteria pulmonalis* lokalisiert. Mit einer Schere wurde über die *Aorta ascendens* transvalvulär der linke Ventrikel eröffnet, ohne die Taschen der Klappe zu beschädigen. Die Kommissuren dienten hierbei als Leitstruktur. Die aortalen Taschenklappen wurden mittels Pinzette und Skalpell herauspräpariert. Die Arbeitsschritte sind in Abbildung 6 nachzuvollziehen. Die Taschenklappen wurden in einer Petrischale mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült und die Ventricularis und die Fibrosa mittels Skalpells abgeschabt, um die valvulären Endothelzellen zu entfernen. Anschließend wurden die drei Taschenklappen in Zellkulturmedium (siehe Tbl. 1) gegeben und in etwa 1 mm² große Fragmente mit einem Skalpell zerkleinert. Die prozessierten Aortenklappen wurden mit zusätzlichem Zellkulturmedium in eine T25-Kulturflasche transferiert und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach sieben Tagen wurde das Zellkulturmedium mit den zerkleinerten Taschen abpipetiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Unter dem Lichtmikroskop wurde die Adhäsion der VIC am Kulturflaschenboden beurteilt. Für die Passage wurden die VIC mit der für die Kulturflasche geeignete Menge an 0,25% Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (Trypsin-EDTA) für drei Minuten im Inkubator von der Kulturflasche gelöst. Nach der Inkubation wurden durch leichtes Beklopfen der Kulturflasche die VIC zusätzlich mechanisch gelöst. Das Trypsin wurde umgehend mit mindestens der doppelten Menge an Zellkulturmedium inaktiviert und in ein Röhrchen überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 500 rpm wurde der Überstand entnommen und das Zellpellet in 5 ml Medium suspendiert. Die in Medium suspendierten VIC wurden in eine T75-Flasche überführt. Sobald die Zellen unter dem Lichtmikroskop zu 90% konfluent waren, wurden die Zellen mittels gleicher Prozedur in eine T225-Kulturflasche passagiert. Für die Versuche wurden die Passagen p5 bis p10 verwendet.

TABELLE 1: ZELLKULTURMEDIUM

Zellkulturmedium	
Dulbecco's Modified Eagle Medium	500 ml
Fetales Kälberserum	50 ml
Nichtessentielle Aminosäuren	5 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
Amphotericin B	5 ml

Tbl. 1: Zusammensetzung des Zellkulturmediums

ABBILDUNG 6: PRÄPARATION OVINER AORTENKLAPPEN

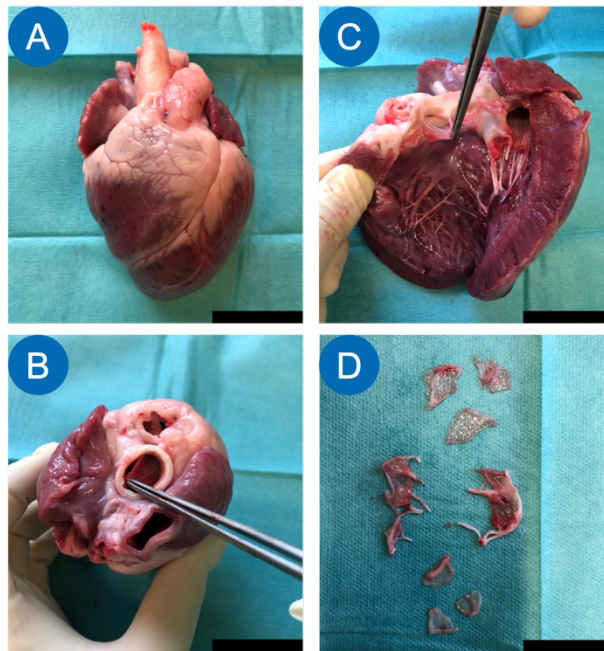


Abb. 6: A: Ovines Herz (anterior) nach Entfernen des Perikards; B: Aortenklappe (*Valvula semilunaris sinistra*) in situ; C: Aortenklappe (*Valvula semilunaris dextra*) D: Herauspräparierte Aorten-, Mitralklappen, und Pulmonalklappen (von oben nach unten). Maßstab \cong 2cm.

2.2 Hydrogelherstellung

2.2.1 Hydrogelherstellung aus Alginate und Gelatine

Die Herstellung von Hydrogelen auf Basis von Alginate- und Gelatine orientierte sich an einem Protokoll von He et al. (2016), welcher 2% Alginate aus Braunalgen (Sigma-Aldrich, USA) und 8% Gelatine aus Schweinehaut (Sigma-Aldrich, USA) verwendete. Die Zusammensetzung für 10 ml Hydrogel kann der Tabelle 2 entnommen werden. Optional kann eine Spitze inerte schwarzer Farbstoff Brilliant Black (Sigma-Aldrich, USA) hinzugegeben werden. Dies erreicht eine Dunkelfärbung des Hydrogels und führt zu einer besseren Visualisierung unter dem Lichtmikroskop. Als Lösungsmittel wurde DMEM, PBS, destilliertes Wasser oder Kochsalzlösung unterschiedlicher Konzentration (0,5% oder 0,9%) verwendet. Diese wurden steril in ein Röhrchen pipettiert und für 20 Minuten in ein 37°C warmes Wasserbad gegeben. Das Alginate-Gelatine-Gemisch wurde abgewogen und unter einer Sterilbank dem gewünschten Lösungsmittel hinzugegeben sowie umgehend mittels Vortex für eine Minute miteinander vermengt. Das Röhrchen wurde für 5h in das 37°C warme Wasserbad gegeben. Das sich langsam lösende Hydrogel wurde

jede Stunde mittels Vortex geschüttelt. Falls das Alginat nach 5h nicht gelöst war, wurde dieses Verfahren so lange weitergeführt, bis das Hydrogel keine sichtbaren Festbestandteile mehr besaß. Das Hydrogel wurde dann 5 min lang bei 3000 rpm zentrifugiert, um Luftbläschen zu entfernen. Anschließend wird das Hydrogel für 10 min in das Wasserbad gegeben. Dies führt zum Wiedererreichen einer gleichmäßigen Temperatur von 37° C des Hydrogels und erleichtert die weitere Verarbeitung. Mit einer 12G Kanüle wird das Hydrogel in eine 10 ml Spritze ohne Lufteinschlüsse überführt.

TABELLE 2: HYDROGEL AUS ALGINAT UND GELATINE

Alginat-/Gelatine-Hydrogel		
Alginat	200	mg
Gelatine	800	mg
Lösungsmittel (DMEM, PBS, Aq. dest., NaCl 0,5% oder NaCl 0,9%)	10	ml
* Optional: Spitze inerte schwarzer Farbstoff		

Tbl. 2: Zusammensetzung des Hydrogels aus Alginat und Gelatine für 10 ml Hydrogellösung.

2.2.2 Hydrogelherstellung aus dezellularisierter extrazellulärer Matrix

Zur Herstellung eines Hydrogels aus dezellularisierter extrazellulärer Matrix (dECM) wurde sich an dem Protokoll von Nehrenheim et al. (2019) orientiert. Die Zusammensetzung für 10 ml Hydrogel kann der Tabelle 3 entnommen werden.

TABELLE 3: HYDROGEL AUS DECM

dECM-Hydrogel		
0,01 M Salzsäure (HCl)	10	ml
Pepsin aus Schweinemagenschleimhaut (Sigma-Aldrich, USA)	40	mg
dECM-Pulver	400	mg
1 M Natronlauge (NaOH) zum Auftitrieren		
Alginat	200	mg
Gelatine	800	mg
* Optional: Spitze inerte schwarzer Farbstoff		

Tbl. 3: Zusammensetzung des Hydrogels aus dezellularisierter extrazellulärer Matrix für 10 ml Hydrogellösung.

2.2.2.1 Präparation der Herzklappen

Für das Herstellen von Hydrogel aus extrazellulärem Matrixgewebe muss das Klappengewebe vollständig dezellularisiert werden. Dafür wurden die Aortenklappen, wie in Kapitel 2.1 geschildert, präpariert. Die Schritte sind in der Abbildung 6 nachzuvollziehen. Die Herzklappen wurden nach Präparation in Beta Isodona gegeben, um eine Kontamination zu vermeiden. Nach 1h wurden die Klappen mehrmals mit PBS gewaschen und in eine frische Flasche mit PBS und 2% Penicillin/Streptomycin gegeben. Die Flaschen wurden auf den Schüttler gestellt und für 1h gewaschen.

2.2.2.2 Dezellularisierung

Es wurden jeweils 30 Taschenklappen in eine Schottflasche in 200 ml Dezellularisierungslösung 1 (siehe Tabelle 4) gegeben und auf den Schüttler bei Raumtemperatur gestellt. Alle 12h wurde die Dezellularisierungslösung A gewechselt. Nach 48h wurden die Aortenklappen in die Dezellularisierungslösung B für weitere 24 h gegeben, wobei nach 12h die Lösung gewechselt wurde. Die Klappen wurden nach erfolgreicher Dezellularisierung in PBS mit 1% Penicillin/Streptomycin bei Raumtemperatur 6 Tage lang auf dem Schüttler gewaschen, um die zytotoxischen Substanzen zu entfernen. Nach jeweils 48h wurde das PBS gewechselt. Die Klappen können bis zu der weiteren Verwendung bei 4°C gelagert werden. Das Protokoll ist als *Workflow* in Tabelle 5 dargestellt.

TABELLE 4: DEZELLULARISIERUNGSLÖSUNG A UND B

Dezellularisierungslösung A		
Natriumazid (NaN ₃) (Carl Roth, Deutschland)	10	mg
Natriumdesoxycholat (DCA) (Merck, Deutschland)	100	mg
Natriumdodecylcholat (SDS) (Sigma-Aldrich, USA)	100	mg
Aqua dest.	200	ml
Dezellularisierungslösung B		
Natriumazid (NaN ₃) (Carl Roth, Deutschland)	10	mg
Aqua dest.	200	ml

Tbl. 4: Zusammensetzung der Dezellularisierungslösungen A und B für eine Menge von 200 ml.

TABELLE 5: PROTOKOLL FÜR DIE DEZELLULARISIERUNG VON AORTENKLAPPEN

	Zeit	Lösung	Schritt	
48	h	0 h	Dezellularisierungslösung A	1. Gabe
		12 h	Dezellularisierungslösung A	1. Wechsel
		24 h	Dezellularisierungslösung A	2. Wechsel
		36 h	Dezellularisierungslösung A	3. Wechsel
24	h	0 h	Dezellularisierungslösung B	1. Gabe
		12 h	Dezellularisierungslösung B	1. Wechsel
144	h	0 h	PBS, 1% PenStrep	1. Gabe
		48 h	PBS, 1% PenStrep	1. Wechsel
		96 h	PBS, 1% PenStrep	2. Wechsel

Tbl. 5: Protokoll für die Dezellularisierung von Aortenklappen. Die Zusammensetzung der Dezellularisierungslösungen A und B sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

2.2.2.3 Pulverisierung

Das Klappengewebe wurde in destilliertem Wasser mit einem Gewebehomogenisator für etwa 1 min prozessiert. Der Überstand an Wasser wird nach dem Zentrifugieren bei 4000 rpm entfernt. Sodann kann das prozessierte Gewebe lyophilisiert (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz) werden. Nach der Gefriertrocknung werden die bereits zerkleinerten Klappen mittels Gewebehomogenisator pulverisiert.

2.2.2.4 Herstellung des Hydrogels

Zum Auflösen des Klappenpulvers wurde eine Verdauung hergestellt. Diese besitzt einen pH-Wert = 2. Nun wurde in einem dECM-Pepsin-Verhältnis von 10:1 das dECM-Pulver hinzugegeben. Das dECM wird in der Verdauung für 48h bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren verdaut. Gegebenenfalls muss der pH-Wert aufgrund der Interaktion der dECM auf einen pH-Wert = 2 mittels 37% HCl-Lösung adjustiert werden. Dies ist der optimale pH-Wert für den Verdau der Proteine durch Pepsin (Christensen, 1955; Schlamowitz & Peterson, 1959). Nach Abschluss der 48 h wurde das entstandene Hydrogel mittels 1 M Natronlauge (NaOH) auf einen physiologischen pH-Wert von 7,4 titriert. Um eine Gelierung zu vermeiden, wurde das Hydrogel dabei auf Eis gelagert. Um ungelöste Pulverpartikel zu entfernen, wurde das Hydrogel bei 4000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde mit einer 12G Braunüle das gelöste Hydrogel auf eine Spritze aufgezogen. Zur Beurteilung des Proteingehaltes des Hydrogels wurde ein BCA-Protein-Assay durchgeführt (siehe Kapitel 2.6.4). Je nach Proteingehalt, wurde durch Zugabe von PBS auf die gewünschte Konzentration titriert. Um eine Druckfähigkeit zu gewährleisten,

wurde der dECM-Lösung (hier: 4 mg/ml) 2% Alginat und 8% Gelatine, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, hinzugegeben.

2.2.3 Hydrogelherstellung aus artifizieller extrazellulärer Matrix

Zur Herstellung artifizieller ECM wurde bovines Kollagen I (Thermo Fisher, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verarbeitet. Die benötigten Mittel sind der Tabelle 6 zu entnehmen und wurden für die Zubereitung auf Eis gelagert. In einem sterilen Röhrchen wurden die Lösungsmittel bis auf das Kollagen hinzugegeben und durch Schütteln vermischt. Anschließend wurde das Kollagen langsam hinzu pipettiert.

TABELLE 6: HYDROGEL AUS AECM

aECM-Hydrogel	
1 M Natronlauge (NaOH)	0,15 ml
5 mg/ml bovines Collagen I	6 mg
PBS	1 mg
Aqua dest.	2,85 ml
* Optional: Spitze inerte schwarzer Farbstoff	

Tbl. 6: Zusammensetzung des Hydrogels aus artifizieller extrazellulärer Matrix für 10 ml Hydrogellösung.

2.2.4 Hinzufügen von VIC zu den Hydrogelen

Für 5 ml Hydrogel wurde eine T-225 Kulturflasche mit circa 8×10^6 VIC verwendet. Es wurden die Schritte des Passagierens, wie in Kapitel 2.1 dargestellt, durchgeführt. Das Zellpellet wurde in 500 µl Zellkulturmedium resuspendiert. Eine 1 ml Spritze mit Kanüle wird dazu genutzt, die Zellsuspension aufzuziehen. Über einen Dreiwegehahn wird die Zellsuspension langsam dem gewünschten Hydrogel zugesetzt. Die 1 ml Spritze wird nun entfernt und durch eine gleichgroße Spritze, in der sich das Hydrogel befindet ersetzt. Durch langsames Auf- und Abziehen kann über den Dreiwegehahn eine gleichmäßige Mischung der Zellen im Hydrogel erreicht werden. Das zellbeladene Hydrogel wird in die Druckspritze (Nordson, USA) gefüllt und mit einer Dosiernadel der Wahl versehen (Nordson, USA). Die in Abbildung 7 dargestellten Dosiernadeln stehen zur Verfügung. Zum einen unterscheiden sich die Dosiernadeln im Durchmesser, zum anderen in der Form (Zylindrische Präzisionsdosiernadel vs. Konische *Smoothflow* Dosiernadel).

ABBILDUNG 7: DOSIERNADELN

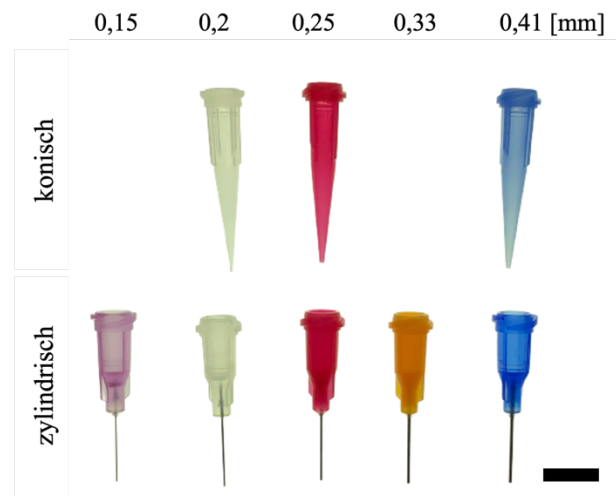


Abb. 7: Abgebildet sind die während der Versuchsreihen verwendeten Dosiernadeln (Nordson, USA). Diese unterscheiden sich zum einen in der Form (konisch vs. zylindrisch), zum anderen im Durchmesser der Spitze. Abkürzungen: mm – Millimeter. Maßstab \cong 5 mm.

2.3 3D-Druck und 3D-Bioprinting

Für das 3D-Drucken- und *Bioprinting* wurde die *Developer Series* des 3D-Bioplotters® (EnvisionTec, Deutschland) genutzt. Der 3D-Biplotter ist in Abbildung 8 dargestellt. Der 3D-Biplotter befindet sich für die Möglichkeit des aseptischen Druckens unter einer Sterilwerkbank. Die wichtigsten Elemente sind beschriftet (s Abb. 8): Mit der Bewegungseinheit kann in x-/y- und z-Richtung jeder mögliche Punkt im Rahmen der Maße des Druckers angesteuert werden. Die Bewegungseinheit besitzt einen Hözensensor, so dass unterschiedlich hohe Plattformen kalibriert werden können. Die Einheit kann jeweils einen Druckkopf aus der Parkposition aufnehmen. Die Dosiernadel des Druckkopfes wird mit einem Lichtsensor kalibriert. Über einen Druckgenerator wird pneumatisch Kraft auf die Druckpatrone generiert, woraufhin sich Material aus der Druckspitze entleert. Über eine Reinigungseinheit kann die Druckspitze gereinigt werden. Die Plattform kann über zu- und abführende Leitungen gekühlt oder erhitzt werden. Unterschiedliche Befestigungen können auf die Plattform angebracht werden, so dass Zellkulturplatten oder Petrischalen festsitzen. Neben dem 3D-Biplotter können sterile Vor- und Nachbereitungen unter der Sterilbank vollzogen werden. Mit der mitgelieferten *Software Visual Machines*

(EnvisionTec, Deutschland) lässt sich der Bioplotter steuern. Weiterhin wird die *PerfactoryRP Software* (EnvisionTec, Deutschland) verwendet, um 3D-Bilddateien in dem benötigten Format (.stl) zu generieren.

ABBILDUNG 8: 3D-BIOPLOTTER® (ENVISIONTEC, DEUTSCHLAND)

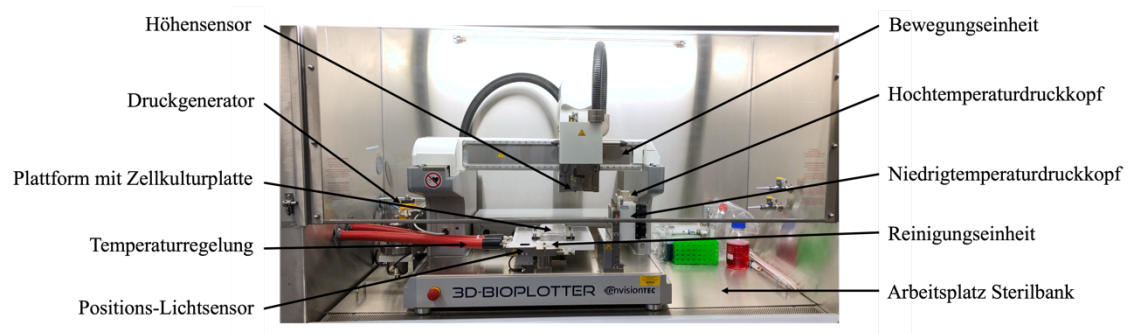


Abb. 8: Der 3D-Bioplotter mit Beschriftung der einzelnen, relevanten Bestandteile

2.3.1 Bearbeitung mit Visual Machines und Druck

Die zur Herstellung verwendeten 3D-Modelle wurden auf Grundlage von Standard-STL-Dateien erzeugt, wie sie vom Hersteller empfohlen oder aus gängigen Open-Source-Datenbanken bezogen werden können. Alternativ besteht die Möglichkeit, STL-Dateien aus DICOM-Daten zu rekonstruieren und weiterzubearbeiten. Die finale Bearbeitung und Parametrisierung der Druckdateien erfolgte in der Software Visual Machines (EnvisionTec, Deutschland), wobei die empfohlenen Einstellungen des Herstellers in Bezug auf Schichthöhe, Materialparameter und Strukturmuster berücksichtigt wurden. Letztere umfassten insbesondere das Gitter-, Waben- und ZigZag-Muster (s. Abb. 9). Die verwendeten Druckparameter sind Kapitel 3.1 zu entnehmen.

ABBILDUNG 9: ÜBERSICHT *PATTERN*

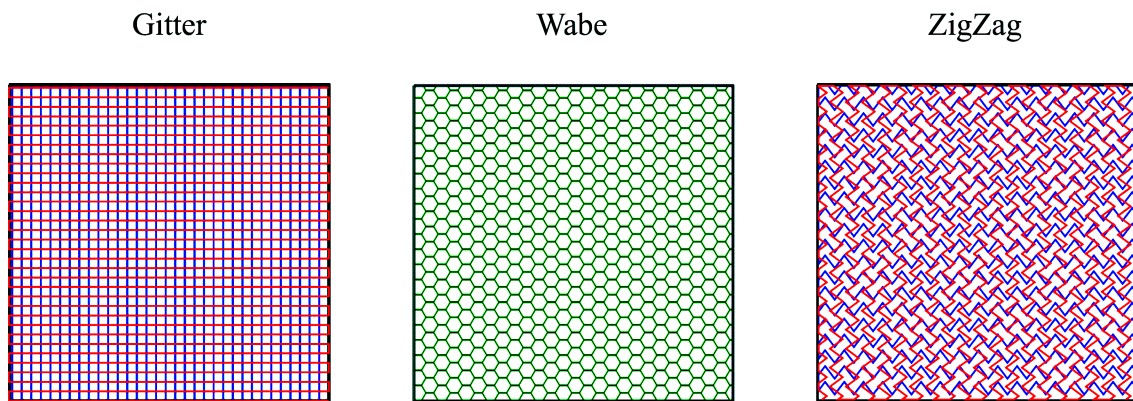


Abb. 9: Übersicht der verwendeten *Pattern*. Von links nach rechts ist das Gitter-, Waben- und ZigZag-Muster, wie in Visual Machines angezeigt, dargestellt. Die äußere Struktur wird schwarz, die innere Struktur farblich dargestellt.

2.3.2 *Postprinting*

Das *Postprinting* beschreibt die Phase nach dem vollendeten Druck. Diese Zeit sollte so kurz wie möglich gewählt werden, um zytotoxische Effekte zu minimieren. Die Phase des *Postprintings* unterscheidet sich einerseits durch die verwendeten Hydrogele. Andererseits in dem Aspekt, ob zellfreie oder VIC-haltige Drucke generiert wurden.

Alginate benötigt nach dem Druck den Schritt des *Crosslinkings* durch zweiwertige Kationen, wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben. Daher wurde ein *Crosslinking* mittels 2%iger Calciumchloridlösung durchgeführt. Nach erfolgreichem Druck wurde eine die Struktur bedeckende Menge an Calciumchloridlösung in das *well* pipettiert. Die Zellkulturplatte wird abgedeckt und für 3 min auf den Schüttler gestellt. Die Calciumchloridlösung wurde abpipettiert. Es erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS.

Aufgrund des Alginateanteils im Hydrogel aus dezellularisierter extrazellulärer Matrix, war auch hier das *Crosslinking*, wie oben beschrieben, obligat.

Das Hydrogel aus artifizierter extrazellulärer Matrix benötigte kein *Crosslinking*. Es geliert aufgrund des Kollagenanteils bei 37° C. Nach dem Druck wurde es einmal mit PBS gewaschen.

Bei zellfreien Drucken wurde PBS mit 2% Penicillin/Streptomycin als bedeckende Lösung hinzugegeben. Bei Zelldrucken wurde Zellkulturmedium verwendet. Die Drucke wurden in den Inkubator bei 37° C und 5 % CO₂ transferiert und je nach Versuchsreihe

für 7, 14, 21 oder 28 Tage inkubiert. Das PBS mit Penicillin/Streptomycin oder das Zellkulturmedium wurde dreimal wöchentlich gewechselt.

2.3.2.1 Herstellen von Natriumcitratlösungen

Es wurden unterschiedliche konzentrierte Natriumcitratlösungen verwendet. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 7 dargestellt. Die Lösungen wurden anschließend steril gefiltert.

TABELLE 7: ZUSAMMENSETZUNG NATRIUMCITRATLÖSUNG

1 mM		
294.1 M Natriumcitrat (Sigma-Aldrich, USA)	29,1	mg
Aqua dest.	1000	ml
2 mM		
294.1 M Natriumcitrat (Sigma-Aldrich, USA)	58,82	mg
Aqua dest.	1000	ml
5 mM		
294.1 M Natriumcitrat (Sigma-Aldrich, USA)	147,05	mg
Aqua dest.	1000	ml

Tbl. 7: Zusammensetzung unterschiedlich molarer Natriumcitratlösungen.

2.4 Lichtmikroskopie

Die Lichtmikroskopie diente zum einen der Beurteilung der Konfluität der VIC-Zellkulturen. Weiterhin basieren einige qualitative Ergebnisse der Versuchsreihen nach Drucken mit Hydrogelen auf Erkenntnissen aus der Lichtmikroskopie. Am geeignetsten war eine 20fache Vergrößerung. Es wurden digitale Aufnahmen mit der Software Leica Application Suite (Leica Microsystems Ltd., USA) erstellt. Sowohl die Stabilität und Degeneration gedruckter Stränge sowie die Zellmorphologie der VIC wurde im Verlauf anhand der Digitalaufnahmen beurteilt.

2.5 Laser-Scanning-Mikroskopie

In dieser Arbeit wurden tote von lebenden Zellen mit dem *Life-/Dead-Assay* detektiert. In Kapitel 2.6.1 wird das *Assay* beschrieben. Das verwendete *Laser-Scanning-Mikroskop* LSM 800 (Carl Zeiss, Deutschland) bietet neben der reinen Mikroskopierfunktion die Möglichkeit digitaler Aufnahmen. Mit Hilfe der Software ZEN (Carl Zeiss, Deutschland)

können Präparate in einer Ebene (2D) oder mehreren Ebenen (3D) in vollem Umfang aufgenommen werden. Neben Einzelbildern wurden die Optionen *Tile Scan* und *Z-Stack* verwendet. Der *Tile Scan* beschreibt die Aufnahme von mehreren Einzelbildern einer Ebene, die automatisch zusammengefügt werden. Die *Z-Stack*-Option nimmt die Bilder in der z-Ebene, also in die Höhe, auf. Das Programm bestimmt die optimale Anzahl an Schichtaufnahmen, um ein verwertbares dreidimensionales Bild zu erzeugen. *Z-Stack* und *Tile Scan* können zusammen kombiniert werden.

2.6 Assays

2.6.1 *Life-/Dead-Assay*

Das *Life-/Dead-Assay* (Life Technologies, USA) kann intakte von apoptotischen Zellen unterscheiden. Das Assay basiert auf den Farbstoffen Calcein-Acetoxyethyl (-AM) und Ethidiumhomodimer. Die Farbstoffe wurden nach Herstellerangaben aufgetaut und eine Färbelösung in einem lichtschuttsicheren Röhrchen angefertigt (siehe Tabelle 8). Da FCS eine Esterasaaktivität hat, sollte kein Zellkulturmedium verwendet werden. In das zu untersuchende *well* wurde so viel Färbelösung hinzugeben, sodass die Kultur vollständig bedeckt war. Die Zellkulturplatte wurde in den Inkubator für 30-45 min bei 37°C und 5% CO₂ gegeben. Die Färbelösung wurde entfernt und zweimal mit PBS gewaschen. Der *cover slip* wurde mittels Pinzette aus dem *well* gehoben und umgekehrt auf einen Objektträger geben. Mittels Laser-Scanning-Mikroskop konnte das Präparat untersucht werden. Das entstandene Bildmaterial wurde mittels ImageJ (National Institutes of Health, USA) ausgewertet. Über ein adaptiertes Makro wird die Anzahl an lebenden und apoptotischen/nekrotischen Zellen automatisch ausgewertet. Das verwendete Makro ist im Anhang zu finden. Der Quotient aus lebendigen und toten Zellen entspricht der *Life-/Dead*-Ratio. Je höher die Ratio, desto mehr lebende Zellen sind in dem Präparat vorhanden.

TABELLE 8: ZUSAMMENSETZUNG FÄRBE LÖSUNG

Färbelösung	
Calcein-Acetoxyethyl (-AM)	5 µl
Ethidiumhomodimer	20 µl
DMEM	10 ml

Tbl. 8: Zusammensetzung der Färbelösung des *Life-Dead-Assays*

2.6.2 CCK-8-Assay

Das Cell Counting Kit-8 (Sigma-Aldrich, USA) dient zur semiquantitativen Detektion von lebenden Zellen. Die ablaufende Reaktion ist dabei die Reduktion des Tatrazoliumsalzes WST-8 zu Formazan, was durch die Anwesenheit von Elektronentransportern lebender Zellen katalysiert wird. Für das Assay wurden die Angaben des Herstellers modifiziert und die zu analysierenden Proben in eine Zellkulturplatte mit 48 *wells* gegeben. Hier wurden die gedruckten zellhaltigen *Scaffolds* transferiert und mit 200 μ l Zellkulturmedium bedeckt. Neben den Proben wurde eine Verdünnungsreihe mit VIC aus frisch passagierten Zellkulturen mit jeweils 200 μ l Zellkulturmedium angefertigt. Eine Hintergrundkontrolle mit reinem Zellkulturmedium wurde hinzugefügt. In alle *wells* wurden 20 μ l der fertigen Reaktionslösung gegeben und für vier Stunden bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Es wurde die Absorption bei 450 nm inklusive einer Referenzwelllänge von 650 nm gemessen. Die Referenzwellenlänge sowie die Hintergrundkontrolle wurden von den Werten abgezogen. Es wurde anschließend eine lineare Funktion der Zellverdünnungsreihe erstellt, mit denen die einzelnen relativen Zellviabilitätswerte der Proben berechnet werden konnten.

2.6.3 LDH-Assay

Das CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay Kit (Invitrogen, USA) ist ein kolorimetrischer Assay zur Bestimmung der zellulären Zytotoxizität. Es wurde nach Herstellerangaben eine Reaktionslösung, eine Lysepuffer, eine Stopplösung und eine Positivkontrolllösung verwendet. In einer Zellkulturplatte mit 96 *wells* wurden 50 μ l Zellkulturmedium aus der zu untersuchenden Probe in mindestens zwei Duplikaten pipettiert. Davon gilt eine Reihe der Messung der Spontan-LDH-Freisetzung und die andere Reihe der maximalen LDH-Aktivität. Optional wurden von der Positivkontrolle 50 μ l in dreifacher Bestimmung mitbestimmt. Als Hintergrundkontrolle wurden 50 μ l Zellkulturmedium als Triplikat in die Zellkulturplatte pipettiert. In die Reihe der maximalen LDH-Aktivität wurden 10 μ l Lysepuffer hinzugegeben. Dies dient der späteren Nivellierung, da es eine Aussage über die Anzahl der insgesamt vorhandenen Zellen angibt. Die Zellkulturplatte wurde für 45 Minuten bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. In jedes *well* wurde anschließend 50 μ l Reaktionslösung hinzugegeben. Die Zellkulturplatte wurde lichtgeschützt für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur auf einen Schüttler gestellt. Nach dieser Zeit wurden

50 µl Stopplösung hinzugegeben. Es folgt die Messung der Absorption bei 490 nm und 680 nm mittels Plate Reader (Tecan Trading AG, Schweiz) und der Software Tecan i control (Tecan Trading AG, Schweiz). Die Auswertung erfolgte in MS Excel (Microsoft Corporation, USA). Die Werte der Absorption bei 680 nm wurden von den Absorptionswerten bei 490 nm sowie der Mittelwert der Hintergrundkontrolle von allen ermittelten Werten subtrahiert. Der Quotient aus der spontanen LDH-Aktivität und der maximalen LDH-Aktivität entspricht der Zytotoxizität des Drucks.

2.6.4 BCA Protein Assay

Der BCA-Protein Assay (ThermoFischer, USA) basiert auf einer Kupferreduktion in Anwesenheit von Proteinen in alkalischem Milieu. Es wurde zur Bestimmung des Protein-gehaltes des Hydrogels aus dezellularisierter Matrix verwendet. Es wurde dafür nach Herstellerangaben eine Verdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) inklusive Negativkontrolle sowie der Reaktionslösung angefertigt. Es wurden jeweils 25 µl pro *well* einer 96 Zellkulturplatte in Duplikaten der BSA-Verdünnungsreihe sowie der Probe pipettiert. Nun wurden 200 µl der Reaktionslösung in jedes *well* gegeben. Im Tecan Reader (Tecan Trading AG, Schweiz) wurde die Absorption bei 562 nm gemessen. Durch Erstellen einer linearen Funktion der BSA-Proteinkonzentration in MS Excel (Microsoft Corporation, USA), kann die Proteinmenge der Probe berechnet werden.

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Grafikgestaltung der Diagramme wurde mittels der Software Graphpad Prism 10 (Graphpad Software Inc., USA) durchgeführt. Zur Auswertung nichtparametrischer Daten ist bei zwei zu vergleichenden Gruppen ein Mann-Whitney-Test, bei mehr als zwei der Kruskal-Wallis-Test mit nachfolgendem Dunn's Test für multiple Vergleiche durchgeführt worden. Die Abbildungen zeigen den Mittelwert mit der Standardabweichung an. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.

2.8 Abbildungen

Die Abbildungen wurden mittel der Software Biorender (www.biorender.com) angefertigt.

2.9 Materialien

Nachfolgend finden sich die oben verwendeten Reagenzien und Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software tabellarisch aufgelistet.

2.9.1 Reagenzien und Chemikalien

TABELLE 9: REAGENZIEN UND CHEMIKALIEN

Produkt / Material	Hersteller	Referenz
Alginic acid sodium salt from brown algae	Sigma-Aldrich	A2033-100G
Betaisodona	Mundi Pharma	10098430
Brilliant Black BN	Sigma-Aldrich	211842-10G
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH	CN93.1
Cell Counting Kit-8 (CCK-8)	Sigma-Aldrich	96992
CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay	Invitrogen by Thermo Fisher	C20301
Demi-Wasser	Otto Fischer GmbH	04914151
DMEM 1X + GlutaMAX™	Gibco (Thermo Fisher Scientific)	31966-021
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) 1X	Gibco (Thermo Fisher Scientific)	14190-094
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich	F7524
Flüssiger Stickstoff	Linde	22005253
Fungizone (Amphotericin B) 50 mg	Cheplapharm Arzneimittel	13739TB24
Gelatin from porcine skin	Sigma-Aldrich	G2500-500G
HCl	Carl Roth	4620.1
Iodine 0,5 mol/l Lösung	VWR Chemicals	30914.295
Isotonische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%)	Fresenius Kabi AG	19PDA060
Life/Dead Viability/Cytotoxicity Kit	Invitrogen by Thermo Fisher	L3224
MEM Non-essential Amino Acid Solution (100X)	Sigma-Aldrich	M7145-100
Natriumazid	Carl Roth GmbH	K305.2
Natriumcitrat tribasisch	Sigma	C8532-500G
Natriumdeoxycholat (DCA)	Merck KGaA	1.06504.0250
Natriumdithionit	Sigma-Aldrich	157953
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich	L3771-100G
Penicillin-Streptomycin (Pen Strep)	Gibco (Thermo Fisher Scientific)	15140-122
Pepsin from porcine gastric mucosa, ≥250 units/mg	Sigma-Aldrich	P6887
Ovine Herzen	Laame Wuppertal	
Trypsin-EDTA 1X 0,25%	Gibco (Thermo Fisher Scientific)	25200-056

Tbl. 9: Reagenzien und Chemikalien mit Angabe des Produktes, des Herstellers und der Referenz

2.9.2 Verbrauchsmaterialien

TABELLE 10: VERBRAUCHSMATERIALIEN

Produkt / Material	Hersteller	Referenz
10/20 Graduated, Filter Tip	Star Lab	S1110-3700
1000mül Graduated, Filter Tip	Star Lab	S1111-6700
12 well plate	Greiner bio-one	665180
200 Graduated, Filter Tip	Star Lab	S1111-1700
24 well plate	Greiner bio-one	662160
48 well plate	Greiner bio-one	677180
6 Well plate	Greiner bio-one	657160
96 well plate	Greiner bio-one	655180
Anatomische Pinzette	Hartmann	991 064/3
BD Blunt Fill Needle 18G	BD	303129
Braunüle ® MT 4/G12	Braun	4206487
Chirurgisch Schere	Hartmann	991 081/3
Combi-Stopper	B. Braun Melsungen AG	4495101
Costar ® 10 ml Stripette®	Corning Incorporated	4488
Costar ® 25 ml Stripette®	Corning Incorporated	4489
Costar ® 5 ml Stripette®	Corning Incorporated	4487
Discofix® C	B. Braun Melsungen AG	16494C
Objektträger 76×26 mm	Carl Roth	H877.1
Einbetttschälchen 25mm	MEDITE	48-6303-00
Eppendorf Tubes ®	Eppendorf AG	0030 120.094
Fluid dispensing system - Aufsatz	Nordson	7012134
Fluid dispensing system - Stopfen	Nordson	7012186
Injekt ® 10ml	Braun	4606108V
Injekt ® 20ml	Braun	4606205V
Injekt ® 5ml	Braun	4606051V
Omnifix®-F 1ml	Braun	9161406V
Petri Dish 140mm	VWR	391-1502
Präzisionsdosiernadel blau konsich	Nordson	7018298
Präzisionsdosiernadel klar konisch	Nordson	7018417
Präzisionsdosiernadel klar präzise	Nordson	7005008
Präzisionsdosiernadel rot konisch	Nordson	7018391
Präzisionsdosiernadel rot präzise	Nordson	7018345
Raucodrape® Pro	Lohmann und Rauscher GmbH	33010
ReliaPrep™ Syringe Filters 0,2 mül	Ahlstrom	760502
Röhrchen 15ml	Greiner bio-one	188271
Röhrchen 50ml	Greiner	210261
Skalpell	Feather	02.001.40.010
Telacomp Kompressen	Hartmann	452135
VWR ® Vacuum Filtration 0,2 mikrrol	VWR	514-0332
Weighing Boats	Heaththrow Scientific	HS1420AA
Zellkulturflaschen 550ml	Greiner bio-one	660175

Tbl. 10: Verbrauchsmaterialien mit Angabe des Produktes, des Herstellers und der Referenz

2.9.3 Geräte

TABELLE 11: GERÄTE

Gerät	Name	Hersteller
3D-Drucker	3D-BIOPLOTTER®	EnvisionTec
Bench	Class II, Type A2	Labogard
Digitale Kamera	iPhone X	Apple California
Inkubator	HERA CELL 240i	ThermoFischer
Konfokales Lasermikroskop	LSM 700	Zeiss
Kryoschneider	CM 1950	Leica
Lichtmikroskop	DMIL LED	Leica Microsystems Ltd.
Lyophilisator	Alpha 1–2 LDplus	Christ
Magnetischer Rührer	Rotilabo magnetic stirrer	Roth
Megafuge	Heraeus	ThermoFischer Scientific
Mikroskopkamera	DFC425 C	Leica Microsystems Ltd.
pH-Meter	inoLab pH 7110	WTW / Xylem Analytics
Pipettierhilfe	Acujet pro	Brand
Schüttler	Polymax 1040	Heidolph
Tecan Reader	Infinite M1000 Pro	Tecan Trading AG
Thermometer	AL LHU 9.235310	Greisinger
Vortex	REAX top	Heidolph
Waage	BP 110 S	sartorius
Wasserbad	GFL	ThermoFischer Scientific

Tbl. 11: Geräte mit Angabe des Gerätenamens und des Herstellers

2.9.4 Software

TABELLE 12: SOFTWARE

Produkt	Hersteller	Referenz
3D Slicer	EnvisionTec	Version 4.10.2
EndNote 20	Clarivate Analytics	Version 20 (Bld 16480)
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc.	Version 10
ImageJ	National Institutes of Health, USA	Version 1.53a
Leica Application Suite	Leica Microsystems Ltd.	Version 3.8
Microsoft® Excel for Mac	Microsoft Corporation	Version 16.46 (21021202)
Microsoft® Power Point for Mac	Microsoft Corporation	Version 16.46 (21021202)
Microsoft® Word for Mac	Microsoft Corporation	Version 16.46 (21021202)
Perfactory RP	EnvisionTec	Version 3.2.3594
ZEN	Zeiss	Version 3.1
Tecan i-control	Tecan Trading AG	Version 1.10
Visual Machines	Envision Tec	Version 2.10.130r12

Tbl. 12: Software mit Angabe des Produktes, des Herstellers und der Referenz

3 ERGEBNISSE

3.1 Druckparameter für Alginat/Gelatine-Hydrogele

Initial wurden zellfreie, doppelschichtige Hydrogelkonstrukte in Gitterform mit verschiedenen Druckparametern mit einer konischen 25-G-Dosiernadel gedruckt und evaluiert. Es wurden die idealen Parameter für Präzision und Druckbarkeit des Konstruktes bei möglichst geringen zu erwartenden Scherkräften untersucht und auf einer Skala zwischen ++ (ideales Ergebnis bzw. niedrigste zu erwartende Scherkräfte) und -- (schlechtestes Ergebnis bzw. höchste zu erwartende Scherkräfte) bewertet (s. Abb.10).

Die idealen Ergebnisse wurden qualitativ mit einem Druck $p = 400$ hPa, einer Düsen geschwindigkeit $v < 20,0$ mm/s, einer Hydrogeltemperatur $T_H = 34$ °C und einer Plattformtemperatur $T_P = 5$ °C ermittelt, wie bereits in Immohr et al. (2022) publiziert. Eine Änderung dieser Werte führte entweder zu einer schlechten Strangqualität oder hatte eine Änderung eines anderen Druckparameters zur Folge, was sich wiederum negativ auf den zu erwartenden Zellstress auswirkte.

Ein zu hoher Druck führte zu einer vermehrten Entleerung des Hydrogels aus der Kartusche. Dies kann durch eine Reduktion der Hydrogeltemperatur oder einer Erhöhung der Druckgeschwindigkeit ausgeglichen werden, was sich jedoch negativ auf den Zellstress und die Präzision auswirkte. Ein zu niedriger Druck führte zu einer verminderten Entleerung des Hydrogel, was durch eine Verringerung der Geschwindigkeit ausgeglichen werden konnte, was wiederum aufgrund eines verlängerten Aufenthaltes des Hydrogel in der nicht temperierten Dosiernadel zu einer erhöhten Viskosität und Verkleben der Dosiernadel führt. Der aufgebrauchte Druck reichte dann nicht mehr aus, um das visköseren Hydrogel zu extrudieren.

Eine zu hohe Geschwindigkeit des Druckkopfes führte insgesamt zu einer verminderten Entleerung des Hydrogels wie ursprünglich designt, sodass das geplante Konstrukt aufgrund einer jeweils zu niedrigen Stranghöhe nicht präzise gedruckt wurde. Es kam zudem zu höheren Scherkräften auf die Zellen. Kompensatorisch konnte entweder der Druck oder die Hydrogeltemperatur erhöht werden, was jedoch wiederum zu einer verminderten Präzision führte. Die gleiche Problematik resultierte bei zu niedriger Geschwindigkeit, da dann zu viel Hydrogel entleert wurde und der Durchmesser des Stranges größer als ursprünglich geplant waren, sodass das spätere Konstrukt nicht fehlerfrei gedruckt werden

konnte. Kompensiert werden konnte eine niedrige Geschwindigkeit durch Reduktion des Druckes oder einer Verringerung der Hydrogeltemperatur.

Eine zu hohe Temperatur des Hydrogels führte zu einer niedrigeren Viskosität des Hydrogels, ergo zu vermehrter Entleerung, was sich negativ auf die Druckfähigkeit und Präzision auswirkte. Dies konnte durch eine erhöhte Geschwindigkeit oder geringeren Druck ausgeglichen werden, wobei die Präzision dabei nur unwesentlich verbessert wurde. Eine zu niedrigere Temperatur führte zu einer hohen Viskosität mit verminderter Entleerung, was kompensatorisch eine Erhöhung des Druckes oder einer Reduktion der Geschwindigkeit benötigte. Auch hier erhöhte sich der zu erwartende Zellstress.

Eine zu hohe Plattformtemperatur führte zu einer verspäteten Gelierung des Hydrogels, währenddessen es aufgrund der Schwerkraft zur Veränderung des Stranges in vertikaler und horizontaler Richtung führte. Eine zu niedrige Plattformtemperatur hatte einen negativen Effekt auf den verursachten Zellstress bei der abrupten Abkühlung.

ABBILDUNG 10: AUSWIRKUNGEN DER DRUCKEREINSTELLUNGEN AUF DEN DRUCK ZELLFREIER HYDROGELE AUS ALGINAT UND GELATINE

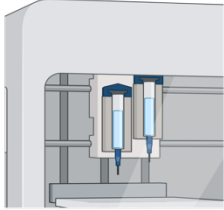




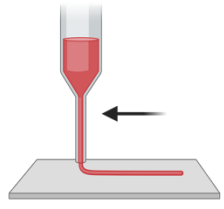









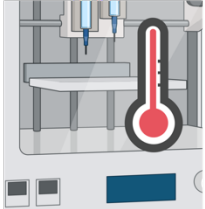




Parameter	Einstellung	Präzision	Druck-fähigkeit	Erwarteter Zellstress	Strang-qualität
 Druck	Niedrig: 100-300 hPa	++	+	++	
	Mittel: 400-1000hPa	+	++	-	
	Hoch: > 1000 hPa	--	--	--	
	Ideal: 300 hPa	++	+	++	
 Geschwindigkeit	Niedrig: < 10 mm/s	+	+	++	
	Mittel: 10-20 mm/s	++	++	+	
	Hoch: > 20 mm/s	-	-	-	
	Ideal: < 20 mm/s	+ / ++	+ / ++	+ / ++	
 Temperatur Hydrogel	Niedrig: < 20°C	++	-	--	
	Mittel: 20-34°C	+	++	+	
	Hoch: 34,1-37°C	-	+	++	
	Ideal: 34°C	+	++	+	
 Temperatur Plattform	Niedrig: < 10°C	++	++	--	
	Mittel: 10-20°C	+	+	-	
	Hoch: > 20°C	--	--	+	
	Ideal: 5°C	++	++	-	

Abb. 10: Zweisichtige zellfreie Hydrogelgerüste (2 % Alginat und 8 % Gelatine in destilliertem Wasser) wurden mit dem 3D-Bioprinter (3D-Biplotter® Developer Series, EnvisionTec, Gladbeck, Deutschland) und einer 25-G-Dosiernadel gedruckt, um die beste Strangqualität zu untersuchen. Änderungen des idealen Drucks, der Geschwindigkeit des Drüsenkopfes und der Temperatur, sowohl des Hydrogels als auch der Plattform, führten zu unpräzisen Ergebnissen. Die Genauigkeit der gedruckten Gerüste wurde qualitativ zwischen ++ (ideales Ergebnis bzw. niedrigste zu erwartende Scherkräfte) und -- (schlechtestes Ergebnis bzw. höchste zu erwartende Scherkräfte) bewertet. Abkürzungen: hPa – Hektopascal; mm/s – Millimeter pro Sekunde; °C – Grad in Celsiuseinheit. Modifiziert nach Immohr et al. (2022).

3.2 Zellfreier Druck mit Alginat-Gelatine-Hydrogel

3.2.1 Einfluss unterschiedlicher Lösungsmittel im zellfreien Druck

Im ersten Schritt wurden zellfreie Drucke mit fünf unterschiedlichen Lösungsmitteln mit nur einer Schicht gefertigt (n=15). Die idealen Druckparameter zum Erreichen eines Einzelstranges wurden für jedes Hydrogel in einem Vortest bestimmt und waren nahezu identisch mit den im vorherigen Unterkapitel aufgeführten Werten. Als Dosiernadel wurde eine konische 410 μm Spitze verwendet. Es wurden PBS, destilliertes Wasser, DMEM und Kochsalz mit 0,9 % sowie 0,5 % verglichen. Dabei entstanden Einzelstränge. Es wurde die subjektive Druckqualität im Lichtmikroskop bewertet. Repräsentative Aufnahmen sind in Abb. 11 dargestellt. Insgesamt fielen ähnliche Druckergebnisse auf. Im Druck mit DMEM sind nicht genau definierbare Inhalte des Lösungsmittels selbst sichtbar (siehe Kreis Abb. 11). Mehr oder minder sind in einigen Drucksträngen kleine Luftblasen zu verzeichnen. Im zeitlichen Zusammenhang war während der Betrachtungszeit von sieben Tagen lichtmikroskopisch keine Veränderung festzustellen.

ABBILDUNG 11: ÜBERSICHT ZELLFREIER DRUCKE IM EINZELSTRANG

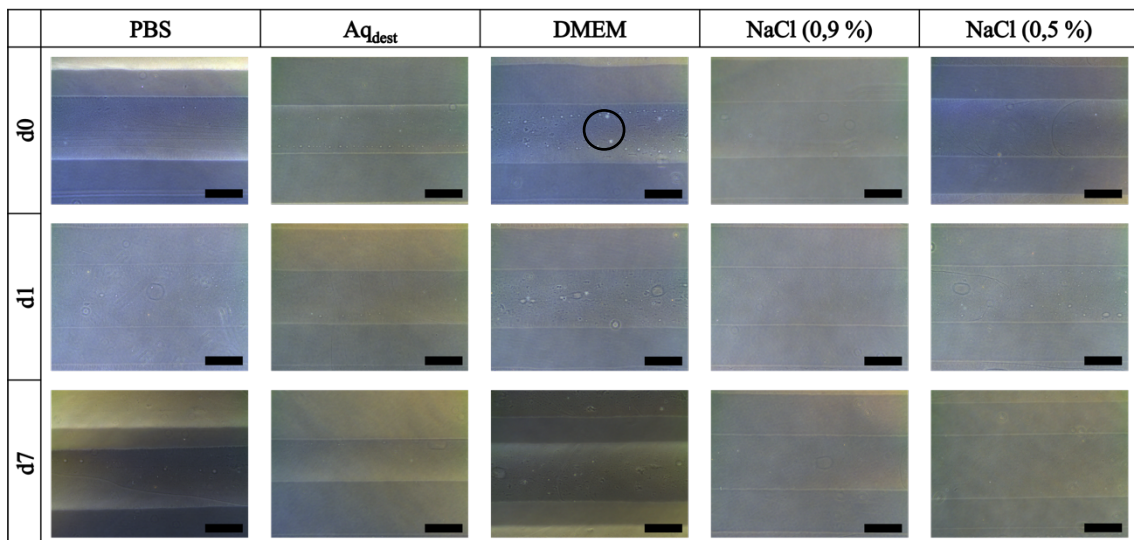


Abb. 11: Es wurden zu den Zeiten d0, d1 und d7 repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von Einzelsträngen mit Alginat-/Gelatine-Hydrogel gefertigt. Sie unterschieden sich im jeweiligen Lösungsmittel (PBS, destilliertes Wasser, DMEM, Kochsalzlösung mit 0,5 % und 0,9 %). Im Druck mit DMEM sind nicht genau definierbare Inhalte des Lösungsmittels sichtbar (siehe Kreis). Abkürzungen: d – Tag; PBS – *Phosphate buffered saline*; Aq_{dest} – destilliertes Wasser; DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; NaCl – Natriumchlorid. Maßstab $\cong 500 \mu\text{m}$.

Zum anderen ist die Stabilität beurteilt worden. Damit ist gemeint, ob die Stränge sich mit der Zeit auflösen, brechen oder den Wechsel des PBS/PenStrep überstehen. Die Tabelle 13 zeigt jeweils in der ersten Spalte der jeweiligen Lösungsmittel die Stabilität der Einzelstränge im Verlauf. Vor allem Kochsalz 0,5 % (15/15) und destilliertes Wasser (10/15) erzielten dabei die besten Ergebnisse. PBS und DMEM hingegen haben deutliche Schwächen im Einzelstrangdruck. Nur drei von 15 Strängen hatten sich bei DMEM als Lösungsmittel bis zum Zeitpunkt d7 noch nicht aufgelöst. Bei Kochsalz 0,9 % war am Ende etwas weniger als die Hälfte der Stränge vorhanden (7/15).

Im zweiten Schritt wurden nun Gitterstränge in identischer Weise verglichen. Ein Gitter bestand aus zwei Schichten beziehungsweise zwei Einzelsträngen, die orthogonal zueinander gedreht sind. Die zweite Schicht ist folglich in einer höher liegenden z-Ebene als die Schicht darunter. Bei dem Druck der zweiten Schicht fällt dabei Hydrogel in den nichtbedruckten Raum zwischen den Strängen. Dabei entsteht eine mehr oder weniger große Verformung des Strangs der zweiten Schicht, wie in Abbildung 12 zu sehen. Das beste Druckergebnis war hinsichtlich der Auflösung und Formstabilität des gedruckten Musters bei Kochsalz 0,5 % zu konstatieren. Bei den restlichen Lösungsmitteln wurden ähnliche Druckergebnisse mit stärkerer Verformung der zweiten Schicht erzielt. DMEM zeigte dabei jedoch einen präzisen Verlauf auf den Strängen der ersten Schicht.

ABBILDUNG 12: ÜBERSICHT ZELLFREIER DRUCKE IN GITTERSTRUKTUR

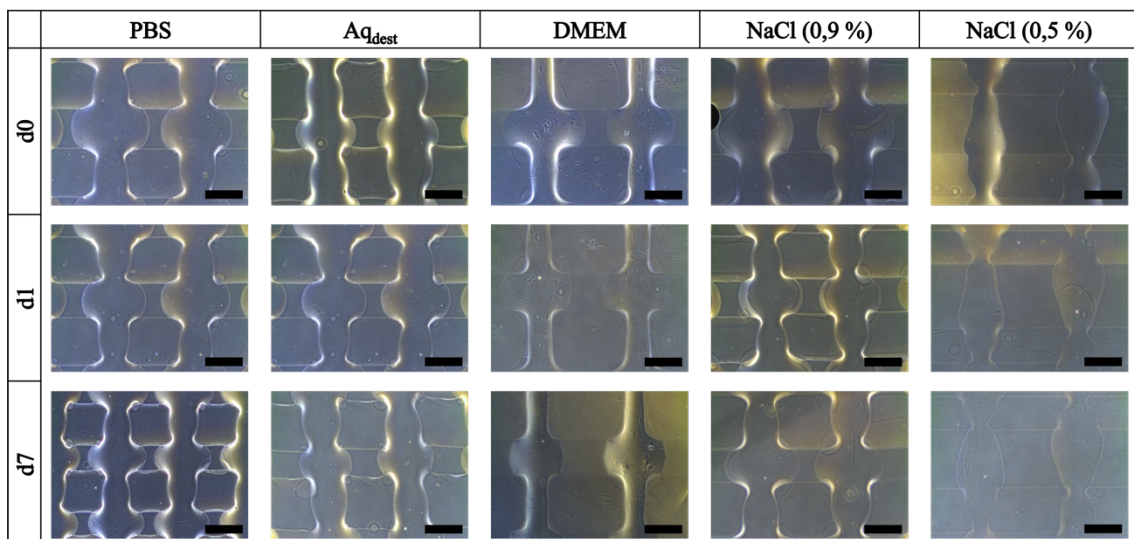


Abb. 12: Es wurden zu den Zeiten d0, d1 und d7 repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von Gittersträngen mit Alginat/Gelatine-Hydrogel gefertigt. Sie unterscheiden sich im jeweiligen Lösungsmittel (PBS, destilliertes Wasser, DMEM, Kochsalzlösung mit 0,5 % und 0,9 %). Abkürzungen: d – Tag; PBS -

Phosphate buffered saline; Aq_{dest} – destilliertes Wasser; DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; NaCl – Natriumchlorid. Maßstab \cong 500 μ m.

In der Tabelle 13 ist in der zweiten Spalte der jeweiligen Lösungsmittel die Stabilität der Gittermuster zum Zeitpunkt d7 dargestellt. Nur bei destilliertem Wasser (14/15), DMEM (14/15) und Kochsalz 0,9 % (13/15) lösten sich ein bis zwei Stränge innerhalb sieben Tagen auf. PBS und NaCl 0,5 % haben im Beobachtungszeitraum nicht an Stabilität verloren.

Für die Entscheidung, welche Hydrogele in weiteren Versuchen getestet wurden, schien es also elementar zu sein, ob ein Hydrogel ein- oder zweischichtig gedruckt wurde, nicht aus welchem Lösungsmittel es bestand. Da in den zweischichtigen Drucken alle Hydrogele gute Stabilitäten aufwiesen, wurden für die Zellversuche drei Lösungsmittel weiter untersucht. Die zwei von denen die höchste Zellviabilität erwartet wurde, PBS und DMEM, sowie Kochsalz 0,5%, da es die größte Stabilität aufwies.

TABELLE 13: STABILITÄT ZELLFREIER DRUCKE

L	PBS			Aq _{dest}			DMEM			NaCl 0,5%			NaCl 0,9 %		
	1	2	ges.	1	2	ges.	1	2	ges.	1	2	ges.	1	2	ges.
d0	9/15	15/15	24/30	15/15	15/15	30/30	15/15	15/15	30/30	15/15	15/15	30/30	15/15	15/15	30/30
d1	3/15	15/15	18/30	14/15	15/15	29/30	13/15	15/15	28/30	15/15	15/15	30/30	15/15	15/15	30/30
d7	3/15	15/15	18/30	10/15	14/15	24/30	3/15	14/15	17/30	15/15	15/15	30/30	7/15	13/15	20/30
%	20	100	60	67	93	80	20	93	57	100	100	100	47	87	67

Tbl. 13: Stabilität zellfreier Drucke im Einzelstrang (1 Layer) und Gitter (2 Layer) zu d0, d1 und d7. Verglichen wurden PBS, destilliertes Wasser, DMEM, Kochsalz mit 0,5 % und 0,9 %. Die Prozentangaben in der letzten Zeile beziehen sich auf den Zeitpunkt d7. Abkürzungen: L – Layer; ges. – gesamt; d – Tag; PBS – *Phosphate buffered saline*; Aq_{dest} – destilliertes Wasser; DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; NaCl – Natriumchlorid.

3.2.2 Einfluss von Druckmustern auf Stabilität

Die Abbildung 13 zeigt in der ersten Zeile die in Visual Machines generierten Druckmuster (Gitter, Wabe ZigZag). In der zweiten Zeile sind zwei Schichten in dem jeweiligen Muster mit Alginat-/Gelatine-Hydrogel (Repräsentativ in der Abbildung wurde das Lösungsmittel NaCl 0,5 % gezeigt) gedruckt worden. Die Innenstruktur ist sowohl beim Gittermuster als auch bei dem Wabenmuster präzise gedruckt worden. Mängel sind an

der äußeren Struktur festzustellen. Bei dem ZigZag-Muster sind sowohl innere als auch äußere Struktur trotz Einstellung der idealen Druckparameter mangelhaft, wie auch in Immohr et al. (2022) publiziert. Im nächsten Schritt (3. Zeile) wurden die beiden besten Muster aus der ersten Phase in 15 Schichten gedruckt. Diese waren das Gitter- und das Wabenmuster. Auch hier sind jeweils bei beiden Mustern leichte Mängel an den Außenstrukturen festzustellen. Die innere Struktur überzeugt vor allem bei dem Wabenmuster mit Präzision.

Hinsichtlich der Stabilität sind alle Strukturen nach d7 noch vorhanden und nicht beschädigt. Die Tabelle 14 zeigt die Ergebnisse. Dabei wurden auch die anderen Lösungsmittel miteinander verglichen. Es waren keine Unterschiede festzustellen.

ABBILDUNG 13: DRUCKMUSTER UND MEHRSCICHTDRUCK

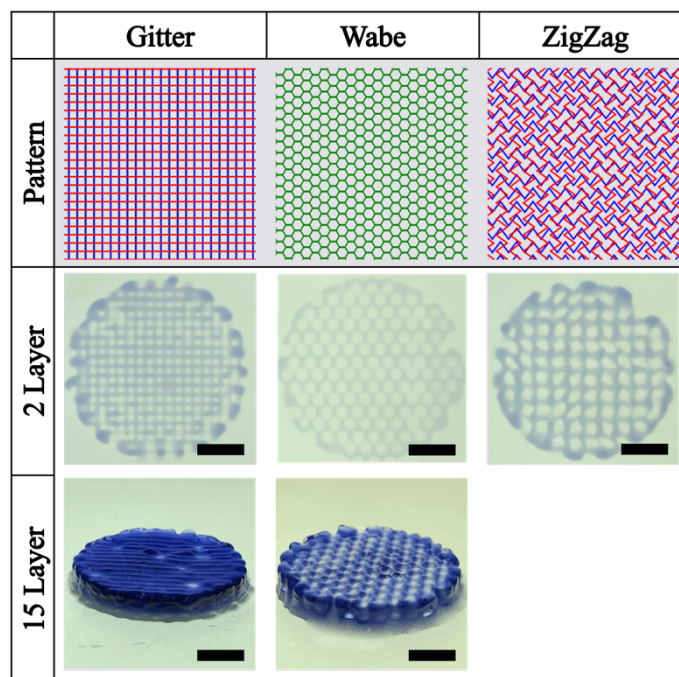


Abb. 13: In der ersten Zeile sind unterschiedliche Druckmuster (Engl.: *Pattern*) in Visual Machines generiert worden. Diese sind das Gittermuster, das Wabenmuster sowie das ZigZag-Muster. In der zweiten Zeile sind die entsprechenden Drucke abgebildet (Repräsentativ wurde das Lösungsmittel NaCl 0,5 % gezeigt). In der dritten Zeile sind Mehrschichtdrucke mit dem Gitter- und Wabenmuster mit 15 *Layer* schräg abgebildet. Maßstab \cong 5mm.

TABELLE 14: STABILITÄT DRUCKMUSTER

P	PBS			Aq _{dest}			DMEM			NaCl 0,5%			NaCl 0,9 %		
	G	W	ZZ	G	W	ZZ	G	W	ZZ	G	W	ZZ	G	W	ZZ
d0	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
d1	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
d7	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Tbl. 14: Stabilität zellfreier Drucke im Gitter-, Waben- und ZigZag-Muster mit 2 Layer zu d0, d1 und d7. Verglichen wurden PBS, destilliertes Wasser, DMEM, Kochsalz mit 0,5 % und 0,9 %. Die Prozentangaben in der letzten Zeile beziehen sich auf den Zeitpunkt d7. Abkürzungen: P – Pattern; G – Gitter; W – Wabe; ZZ – ZigZag; d – Tag; PBS – *Phosphate buffered saline*; Aq_{dest} – destilliertes Wasser; DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; NaCl – Natriumchlorid.

Mit den daraus resultierenden Ergebnissen wurde ein komplexerer Mehrschichtdruck angestrebt. In Zusammenhang mit der Thematik dieser Arbeit wurde sich für den Druck einer gesunden Aortenklappe mit dem Waben- und Gittermuster entschieden. Die .stl Datei wurde dafür aus der öffentlichen Datenbank des *National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIH 3D)* entnommen. Die Abbildung 14 zeigt das Druckergebnis aus unterschiedlichen Perspektiven. Beide Druckmuster erzielten präzise Ergebnisse. Bei dem Wabenmuster sind Luft einschüsse zu beobachten.

ABBILDUNG 14: AORTENKLAPPE MIT GITTER- UND WABENMUSTER GEDRUCKT

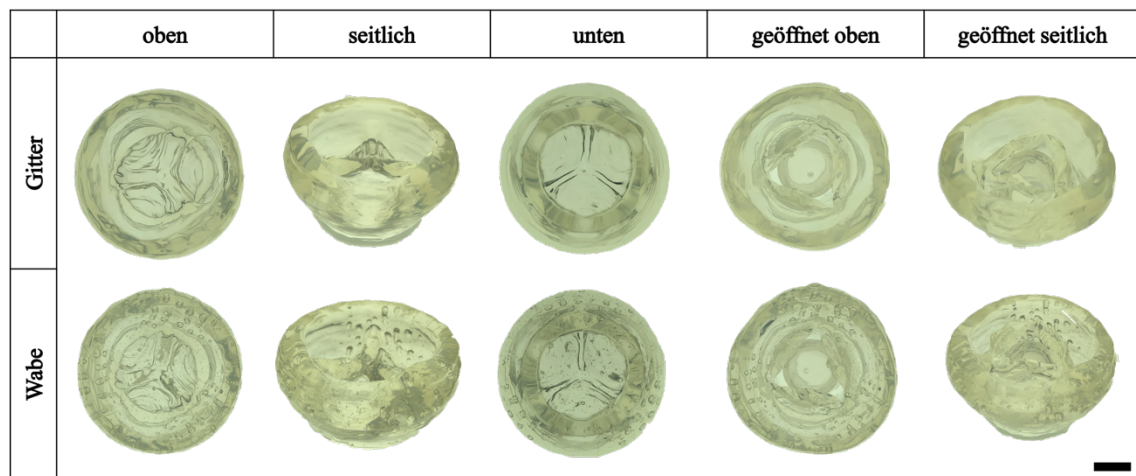


Abb. 14: Die Abbildung zeigt den Druck zweier Aortenklappenmodelle mittels Alginate-/Gelatine-Hydrogel (PBS) mit dem Gittermuster (oben) und dem Wabenmuster (unten). Die .stl Datei wurde dafür aus der öffentlichen Datenbank des *National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIH 3D)* entnommen.

Die Herzklappe wurden aus unterschiedlichen Perspektiven fotografiert. Um die einzelnen Taschenklappen zu veranschaulichen, wurde ein Mikroreaktionsgefäß in die Öffnung der Klappe positioniert. Maßstab \cong 5 mm.

3.3 Zelldruck mit VIC und Alginate-Gelatine-Hydrogel

3.3.1 Einfluss unterschiedlicher Lösungsmittel im Zelldruck

Es wurden Zelldrucke (VIC) mit drei unterschiedlichen Lösungsmitteln verglichen. Wie bereits in Kapitel 3.2.1 erörtert sind PBS, DMEM und Kochsalzlösung mit 0,5 % verwendet worden (jeweils $n=15$). In Hinsicht auf das *Pattern* kamen die Gitter- oder Wabenstruktur in Frage. Da in der Literatur am häufigsten die Gitterstruktur verwendet wird, wurde auch hier diese verwendet. Im weiter unten aufgeführten Unterkapitel 3.3.2 wird das *Pattern* als Einfluss auf die Zellviabilität behandelt. Als Dosiernadel wurde mit einer konischen 410 μm Spitze gedruckt. Die Druckmuster waren Einzel- (1 *Layer*) und Gitterstränge (2 *Layer*). Diese wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten lichtmikroskopisch aufgenommen. Nach 21 Tagen Inkubation wurde die relative Zellviabilität der jeweiligen Stränge mittels CCK-8-Assay untersucht. Erweitert wurde die Versuchsreihe mit dem Druck in zwei- und fünfschichtigen Gitterdrucken, welche zum Zeitpunkt d21 mittels Life-/Dead-Assay ausgewertet wurden.

3.3.1.1 Lichtmikroskopische und makroskopische Auswertung

Die Abbildung 15 zeigt die lichtmikroskopischen Aufnahmen von Einzelsträngen. Die Stränge waren zum Zeitpunkt d0 bei allen Lösungsmitteln ähnlich. Ab d7 zeigten sich hinsichtlich der Morphologie und Proliferation Unterschiede zwischen DMEM und PBS zu Kochsalz 0,5 % (siehe Pfeil Abb. 15). Ab d14 sind die Stränge vollständig mit VIC gefüllt. Bei Kochsalz 0,5 % ist in keinem Stadium eine Differenzierung oder Proliferation zu erkennen.

ABBILDUNG 15: ÜBERSICHT ZELLDROPCKE IM EINZELSTRANG

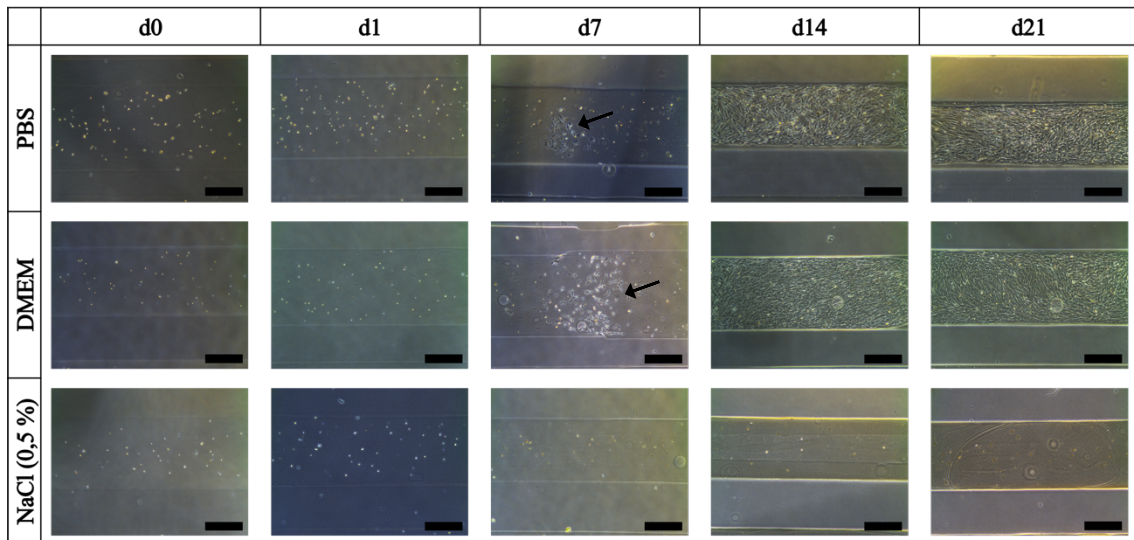


Abb. 15: Es wurden zu den Zeiten d0, d1, d7, d14 und d21 repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von Einzelsträngen mit Alginat/Gelatine-Hydrogel gefertigt. Sie unterscheiden sich im jeweiligen Lösungsmittel (PBS, DMEM, Kochsalzlösung mit 0,5 %). Die Pfeile in den Aufnahmen zu DMEM und PBS zu d7 zeigen den Beginn von Proliferationsclustern der VIC. Abkürzungen: d – Tag; PBS - *Phosphate buffered saline*; DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; NaCl – Natriumchlorid. Maßstab $\cong 500 \mu\text{m}$.

Die Abbildung 16 zeigt die lichtmikroskopischen Aufnahmen von Gittersträngen. Auch hier ist zu d0 das Ausgangsstadium identisch. Ab dem Zeitpunkt d7 zeigen sich in DMEM-basiertem Hydrogele VIC erste Anzeichen von Differenzierung und Proliferation (siehe Pfeil Abb. 16). Zum Zeitpunkt d14 sind die Stränge vollständig mit VIC ausgefüllt. Bei PBS und Kochsalz 0,5 % ist diese Entwicklung nicht zu beobachten.

ABBILDUNG 16: ÜBERSICHT ZELLDRUCKE IN GITTERSTRÄNGEN

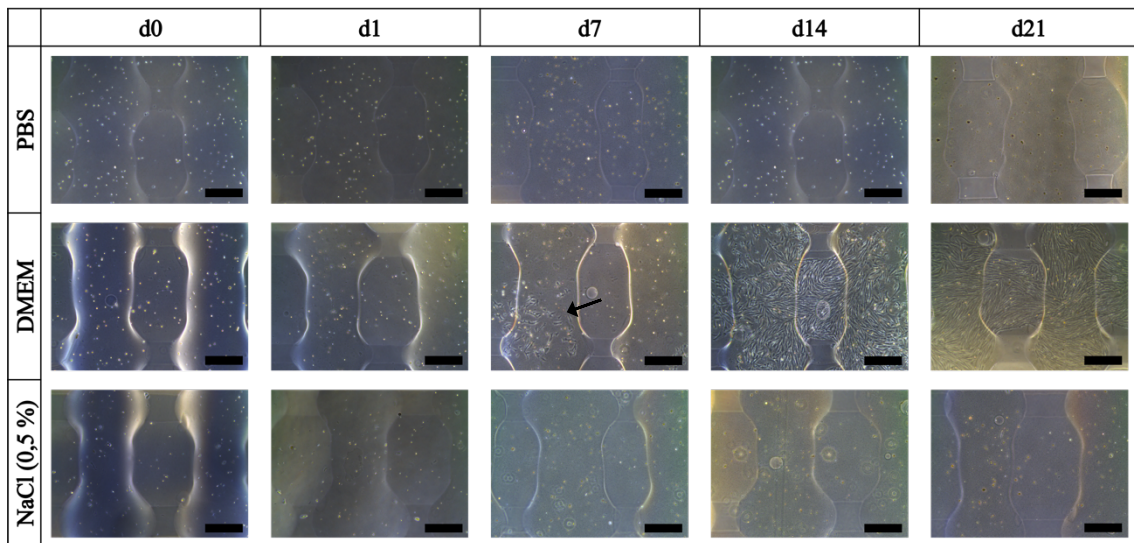


Abb. 16: Es wurden zu den Zeiten d0, d1, d7, d14 und d21 repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von Gittersträngen mit Alginat-/Gelatine-Hydrogel gefertigt. Sie unterscheiden sich im jeweiligen Lösungsmittel (PBS, DMEM, Kochsalzlösung mit 0,5 %). Der Pfeil in den Aufnahmen zu DMEM zu d7 zeigen den Beginn von Proliferationsclustern der VIC. Abkürzungen: d – Tag; PBS - *Phosphate buffered saline*; DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; NaCl – Natriumchlorid. Maßstab \cong 500 μ m.

Die Tabelle 15 zeigt die Stabilität der Zelldrucke zu unterschiedlichen Zeitpunkten für die untersuchten Lösungsmittel. Bei PBS und DMEM waren bei den Einzelsträngen zum Ende des Beobachtungszeitraumes 14 von 15 Strängen (93 %), bei Kochsalz 0,5 % sieben von 15 Strängen (47 %) vorhanden. Bei den zweischichtigen Gitterdrucken waren bei allen Lösungsmitteln die Stränge zum Ende vorhanden. Insgesamt betrachtet waren am Ende bei DMEM und PBS 29 von 30 Strängen (97 %) vorhanden, bei NaCl 0,5 % 22 von 30 (73%).

TABELLE 15: STABILITÄT ZELLDROPCKE

L	PBS			DMEM			NaCl 0,5 %		
	1	2	ges.	1	2	ges.	1	2	ges.
d0	15/15	15/15	30/30	15/15	15/15	30/30	15/15	15/15	30/30
d1	15/15	15/15	30/30	14/15	15/15	29/30	13/15	15/15	28/30
d7	15/15	15/15	30/30	14/15	15/15	29/30	11/15	15/15	26/30
d14	14/15	15/15	30/30	14/15	15/15	29/30	8/15	15/15	23/30
d21	14/15	15/15	29/30	14/15	15/15	29/30	7/15	15/15	22/30
%	93	100	97	93	100	97	47	100	73

Tbl. 15: Stabilität der Zelldropcke im Einzelstrang (1 Layer) und Gitter (2 Layer) zu d0, d1, d7, d14 und d21. Verglichen wurden PBS, DMEM und Kochsalz mit 0,5 %. Die Prozentangaben in der letzten Zeile beziehen sich auf den Zeitpunkt d7. Abkürzungen: L – Layer; ges. – gesamt; d – Tag; PBS – *Phosphate buffered saline*; Aq_{dest} – destilliertes Wasser; DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; NaCl – Natriumchlorid.

3.3.1.2 Relative Zellviabilität zu d21

Die Abbildung 17 zeigt die Auswertung der in Kapitel 3.3.1.1 lichtmikroskopisch gezeigten Einzel- und Gittersträngen mittels auf DMEM normierten CCK-8-Assays nach 21 Tagen Inkubation (n=6). Bei den Einzelsträngen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen DMEM (M = 1,00, SD = 0,29, SE = 0,12) und NaCl 0,5 % (M = 0,29, SD = 0,29, SE = 0,12) zugunsten DMEM gefunden werden (p = 0,0074). Zwischen DMEM und PBS (M = 0,58, SD = 0,38, SE = 0,15) sowie PBS und NaCl 0,5 % konnte kein signifikanter Unterschied ausgemacht werden (p-Wert > 0,05). Auch bei den Gitterstrukturen war zwischen den einzelnen Lösungsmitteln kein signifikanter Unterschied feststellbar (DMEM: M=0,82, SD=0,07, SE=0,03; PBS: M=0,74, SD=0,09, SE=0,04; NaCl 0,5 %: M=0,70, SD=0,17, SE=0,07) (p-Wert > 0,05) (Immohr et al., 2022).

ABBILDUNG 17: VERGLEICH LÖSUNGSMITTEL IM CCK-8-ASSAY

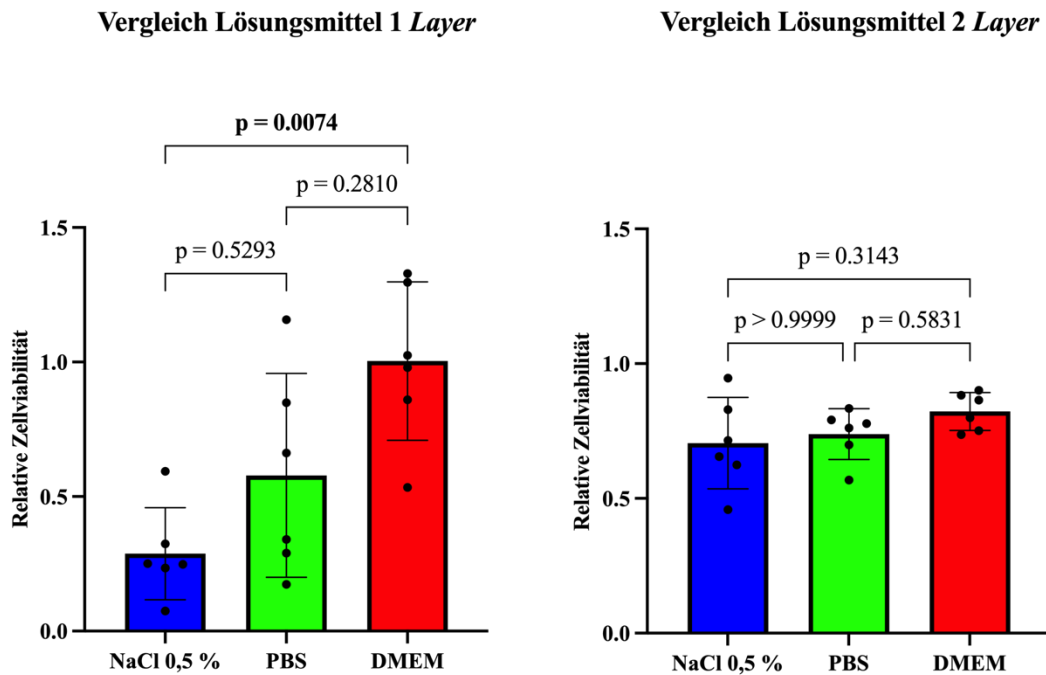


Abb. 17: Links: CCK-8-Assay Einzelstrang (1 Layer) d21; Rechts: CCK-8-Assay Gitter (2 Layer) d21. Jeweils n = 6. Abkürzungen: d – Tag; PBS - *Phosphate buffered saline*; DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; NaCl – Natriumchlorid.

3.3.1.3 Life-/Dead-Auswertung zu d21

Für die Auswertung mittels Life-/Dead-Assay wurde aus technischen Gründen eine modifizierte Versuchsreihe verwendet und auf die Analyse von Einzelsträngen verzichtet. Stattdessen wurde ein zwei- und fünfschichtiger Druck verwendet. Die Abbildung 18 zeigt oben die Auswertung des Life-/Dead-Assays (n=16). Unten sind die digitalen Aufnahmen zu sehen. In den zweischichtigen Drucken nimmt die Life-/Dead-Ratio von DMEM (M = 0,91, SD = 0,06, SE = 0,01) zu PBS (M = 0,66, SD = 0,053, SE = 0,013) zu NaCl 0,5 % (M = 0,62, SD = 0,065, SE = 0,016) ab. DMEM zeigt dabei einen signifikanten Unterschied sowohl zu PBS ($p < 0,0001$) als auch zu NaCl 0,5 % ($p < 0,0001$). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich PBS zu NaCl 0,5 % ($p = 0,53$). Bei der Betrachtung des fünfschichtigen Druckes hat DMEM (M = 0,73, SD = 0,057, SE = 0,014) die größte Überlebensrate der VIC. PBS (M = 0,66, SD = 0,053, SE = 0,013) und NaCl 0,5 % (M = 0,67, SD = 0,071, SE = 0,018) liegen etwa gleichauf. Hier zeigt sich

nur ein signifikanter Unterschied zwischen DMEM und PBS ($p = 0,0047$) (Immohr et al., 2022).

ABBILDUNG 18: VERGLEICH LÖSUNGSMITTEL IM LIFE-/DEAD-ASSAY

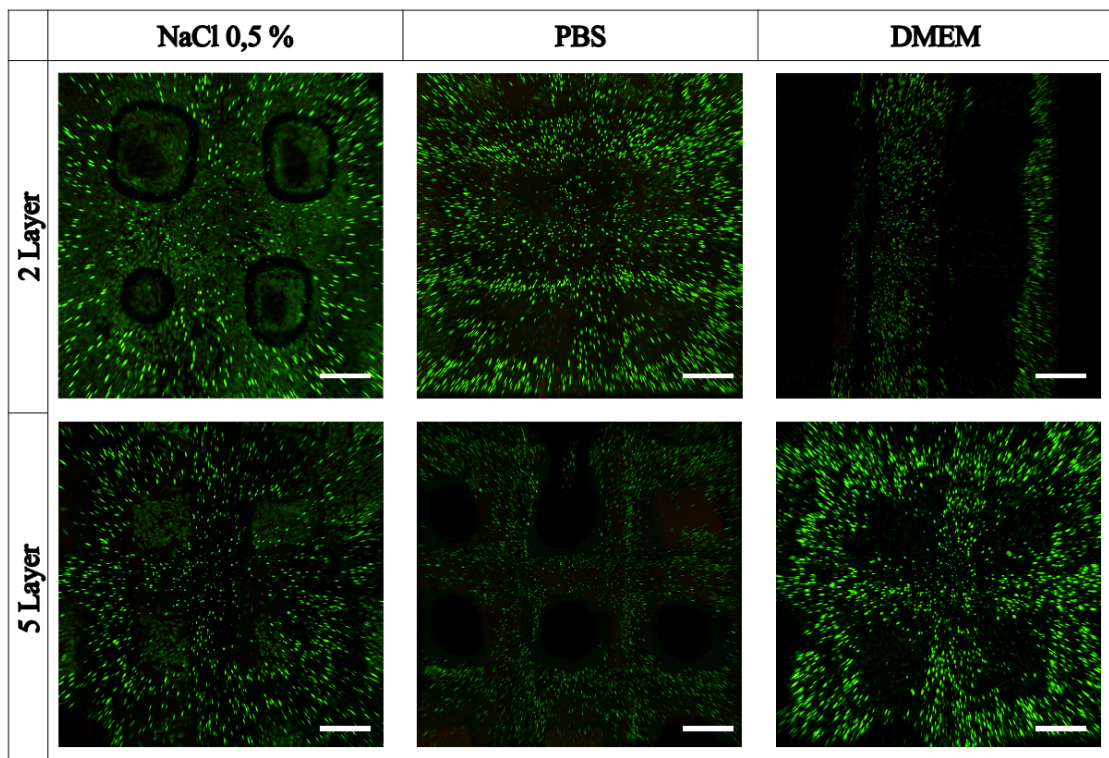
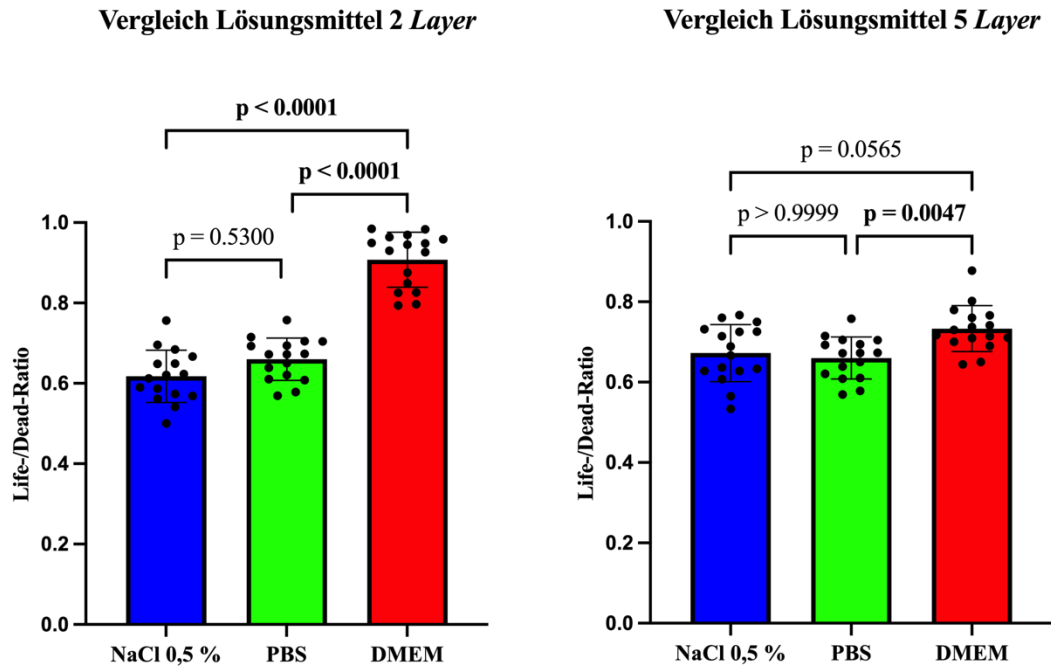


Abb. 18: Oben links: Life-/Dead-Assay Gitter (2 Layer) d21; Oben rechts: Life-/Dead-Assay Gitter (5 Layer) d21; Unten: 3D-Life-/Dead-Bilder Gitter (2 Layer und 5 Layer). Dabei werden lebendige Zellen grün gefärbt (Calcein-AM) und tote Zellen rot (Ethidiumhomodimer). Abkürzungen: d – Tag; PBS - *Phosphate buffered saline*; DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; NaCl – Natriumchlorid. Maßstab \triangleq 1000 μm .

Abbildung 18 zeigt unten die dreidimensionalen Life-/Dead-Aufnahmen. Die grüne Färbung entspricht lebenden Zellen, eine Rotfärbung die Nekrose oder Apoptose von Zellen. Bis auf den zweischichtigen DMEM-Druck kann das Gittermuster erkannt werden. Bei beiden Drucken mit NaCl 0,5 % ist zudem zu erkennen, wie auf dem Zellkulturplattenboden die Zellen aus dem Hydrogel ausgebrochen sind. Dies ist bei PBS und DMEM nicht geschehen.

3.3.2 Einfluss des Druckmusters bei Mehrschichtdrucken auf die Zellviabilität

Es wurde untersucht, ob das Druckmuster einen entscheidenden Einfluss auf die Zellviabilität innerhalb des Hydrogels hat. Dafür wurden die bis dahin besten Lösungsmittel, PBS und DMEM, als fünfzehnschichtiges Gitter- und Wabenmuster gedruckt. In Abbildung 19 sind diese lichtmikroskopisch dargestellt. Zu den Tagen d0 und d1 befinden sich Lufteinschlüsse in den jeweiligen druckfreien Räumen. Diese zeigen sich dunkel. Aufgrund der hohen Schichtanzahl hat sich inertes Färbungsmittel an d0 bis d1 in dem Medium gelöst. Ab d7 sind diese verschwunden. Nach den Medienwechseln ist die Verfärbung verschwunden. Insgesamt können die mehreren Schichten erahnt werden. Im Beobachtungszeitraum sind keine zellmorphologischen Veränderungen sichtbar. Hinsichtlich des Hydrogels konnten mit DMEM präzisere Druckergebnisse erzielt werden.

Nach d28 wurden die jeweiligen Mehrschichtdrucke mittels CCK-8-Assays hinsichtlich der relativen Zellviabilität verglichen ($n=4$). In Abbildung 20 sind die Ergebnisse dargestellt. Links zeigt dabei die Gesamtbetrachtung. Das Gittermuster mit DMEM hat numerisch die höchsten Zellviabilitäten erzielt ($M = 0,67$, $SD = 0,101$, $SE = 0,051$) gefolgt vom Gittermuster gedruckt mit PBS ($M = 0,54$, $SD = 0,046$, $SE = 0,023$). Anschließend folgen das Wabenmuster mit DMEM ($M = 0,52$, $SD = 0,137$, $SE = 0,068$) sowie das Wabenmuster mit PBS ($M = 0,48$, $SD = 0,062$, $SE = 0,031$). Die genannten Ergebnisse sind jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$). Betrachtet man nun das Lösungsmittel allein, also

PBS ($M = 0,51$, $SD = 0,058$, $SE = 0,02$) und DMEM ($M = 0,59$, $SD = 0,14$, $SE = 0,049$), kann auch kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,1949$). Anders sieht es bei der alleinigen Betrachtung des Druckmusters aus. Die Gitterstruktur ($M = 0,60$, $SD = 0,10$, $SE = 0,036$) erzielt signifikant bessere relative Zellviabilitäten als das Wabenmuster ($M = 0,50$, $SD = 0,10$, $SE = 0,035$) ($p = 0,0499$). Diese Ergebnisse wurden ebenfalls in Immohr et al. (2022) publiziert.

ABBILDUNG 19: ÜBERSICHT MEHRSCHICHTZELLDRUCKE (15 SCHICHTEN)

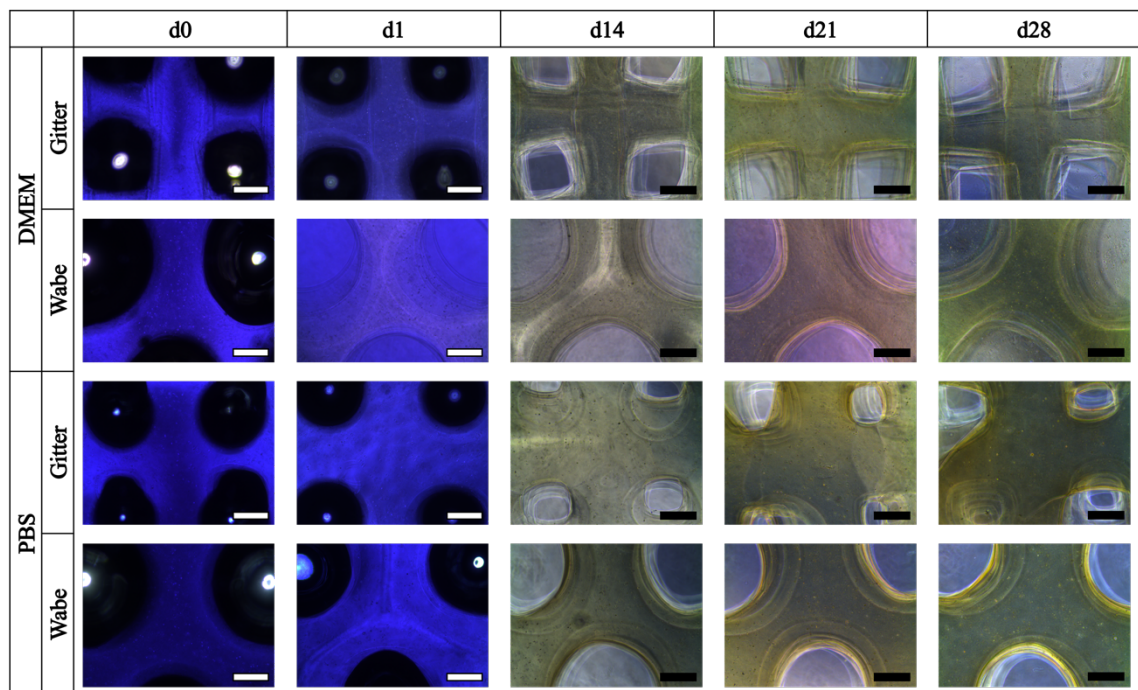


Abb 19: Es wurden zu den Zeiten d0, d1, d14, d21 und d28 repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von Mehrschichtdrucken mit 15 Schichten gefertigt. Es wurde Alginat/Gelatine-Hydrogel mit PBS oder DMEM verwendet. Als Druckmuster wurden das Waben- und Gittermuster verglichen. Abkürzungen: d – Tag; PBS - *Phosphate buffered saline*; DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*. Maßstab $\cong 500 \mu\text{m}$.

ABBILDUNG 20: VERGLEICH MEHRSCHICHTDRUCKE IM CCK-8-ASSAY

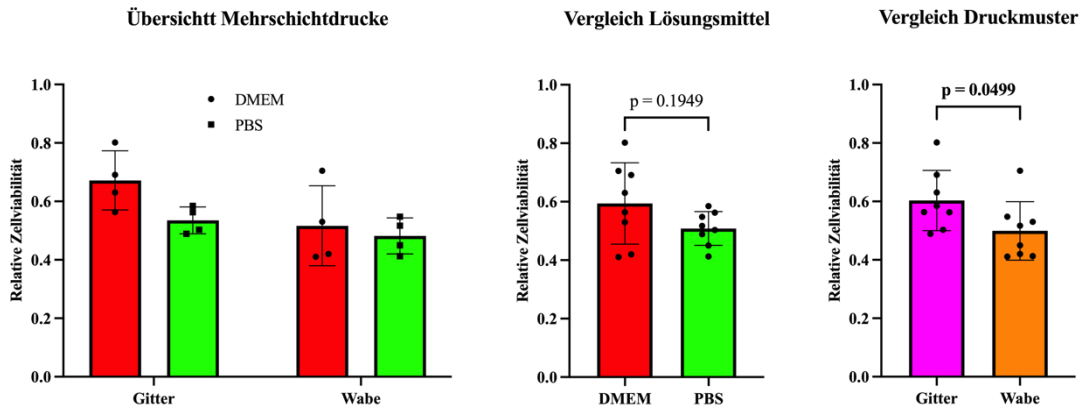


Abb. 20: Links: CCK-8-Assay von Mehrschichtdrucken (15 Schichten) mit DMEM- und PBS-Hydrogel als Gitter- und Wabenmuster gedruckt zu d28; Mitte: CCK-8-Assay Betrachtung Lösungsmittel; Rechts: CCK-8-Assay Betrachtung Druckmuster. Abkürzungen: d – Tag; PBS - *Phosphate buffered saline*; DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*.

3.3.3 Einfluss der Druckerspitzen auf die Zellviabilität

Um die physikalische Zellschädigung des Druckvorganges zu minimieren, wurden zwei Versuchsreihen angelegt. Eine Versuchsreihe mit Dosiernadelspitzen unterschiedlichen Durchmessers und Form wurde als Vortest mittels Life-/Dead-Assay 8h nach dem Druck ausgewertet. Die Abbildung 21 zeigt links die Ergebnisse. Als Kontrolle wurde das Hydrogel nach Mischen in dem Dreiweggehahn ohne anschließenden Druckvorgang definiert. Hier liegt die Life-/Dead-Ratio bei 90 %. Die Ratio nahm im Vergleich zur Kontrolle proportional zum Durchmesser der Dosiernadel ab, wobei bei den präzisen Dosiernadeln jeweils numerisch höhere Überlebensraten im Vergleich zu den konischen festzustellen waren (0,41 mm k: 78%; 0,41 mm p: 89%; 0,25 mm k: 63%; 0,25 mm p: 86%; 0,2 mm p: 69%). In jedem Fall scheint die Ratio eines kleineren Durchmessers mit präziser Spitze über der Ratio einer größeren Dosiernadel mit konischer Spitze zu liegen. Diese Ergebnisse sind jedoch aufgrund der Anzahl untersuchter Stränge nicht statistisch signifikant. In der Abb. 21 unten sind die entsprechenden Ausschnitte des Life-/Dead-Assays in gleicher Reihenfolge dargestellt.

In der zweiten Versuchsreihe wurde ein LDH-Assay 8h (n=12) nach dem Druck durchgeführt. Mit dem Ziel so präzise wie möglich drucken zu wollen, wurden nun Dosiernadeln geringeren Durchmessers gewählt. Es zeigt sich trotzdem eine ähnliche Reihenfolge

(0,25 mm k: M = 0,69, SD = 0,12, SE = 0,033; 0,25 mm p: M = 0,54, SD = 0,19, SE = 0,054 ; 0,2 mm k: M = 0,064, SD = 0,2, SE = 0,059; 0,2 mm p: M = 0,55, SD = 0,073, SE = 0,021; 0,15 mm p: M = 0,058, SD = 0,16, SE = 0,046), wobei zwischen der konisch 250 µm-Spitze und der präzisen 250 µm-Spitze ein signifikanter Unterschied mit Vorteil einer präzisen Dosiernadel festgestellt werden konnte ($p = 0,009$).

ABBILDUNG 21: VERGLEICH DOSIERNADELN

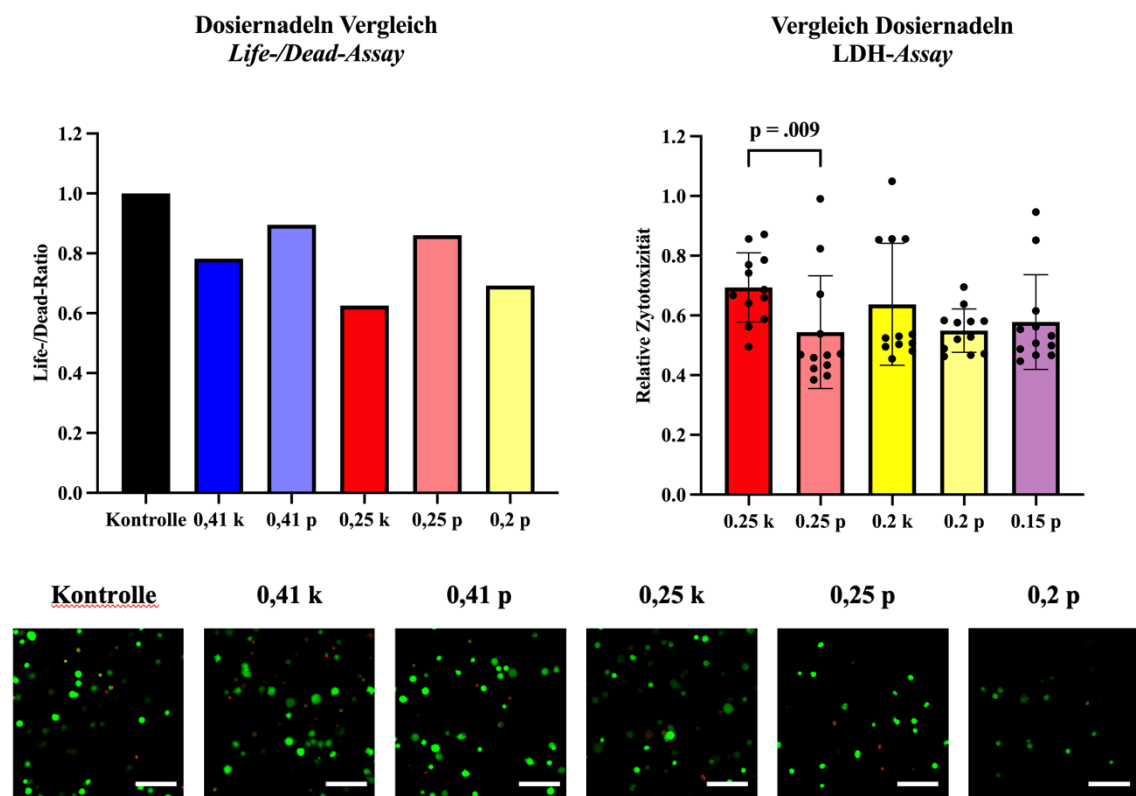


Abb. 21: Oben links: Auswertung *Life-/Dead-Assay* unterschiedlicher Dosiernadeln 8h nach Druck; Unten: Zugehörige digitale Ausschnitte *Life-/Dead-Assay*. Oben rechts: Auswertung *LDH-Assay* unterschiedlicher Dosiernadeln 8h nach Druck. Dabei werden lebendige Zellen grün gefärbt (Calcein-Acetoxyethyl (-AM)) und tote Zellen rot (Ethidiumhomodimer). Abkürzungen: k – konisch; p – präzise. Maßstab $\cong 200 \mu\text{m}$.

3.3.4 Einfluss von Natriumcitrat auf die Zellviabilität

Um den Einfluss von Natriumcitrat auf die relative Zellviabilität zu untersuchen, wurden zwei Versuchsreihen gestaltet. Es wurden zwei ($n=9$) oder fünf Schichten ($n=3$) in Wa-
benform gedruckt. Die Drucke wurden jeweils nur mit Medium oder mit zusätzlich 1

mmol, 2 mmol oder 5 mmol Natriumcitrat inkubiert. Die Abbildung 22 zeigt die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Drucke mit zwei Schichten. Festzuhalten ist die Zellproliferation zum Zeitpunkt d7 in Medium sowie im Medium mit 1 beziehungsweise 2 mmol Natriumcitrat (siehe Pfeile Abb. 22). Zum Zeitpunkt d14 zeigen sich wieder zellmorphologische Unterschiede, sodass die Stränge ausgefüllt wurden. Bei dem Medium mit 5 mmol Natriumcitrat sind keine Veränderungen ab d0 sichtbar. An d28 waren alle Wabenmuster aufgelöst, sodass keine Aufnahme angefertigt werden konnte.

Insgesamt zeigten sich die Hydrogele zu denen Natriumcitrat hinzugegeben wurde subjektiv deutlich labiler je höher die Konzentration war. Es zeigte sich also nicht wie versprochen, dass die Zell-Zell-Verbindungen bzw. die Produktion von extrazellulärer Matrix ausreichte, um das Gerüst aufrecht zu erhalten.

ABBILDUNG 22: EINFLUSS VON NATRIUMCITRAT (2 SCHICHTEN)

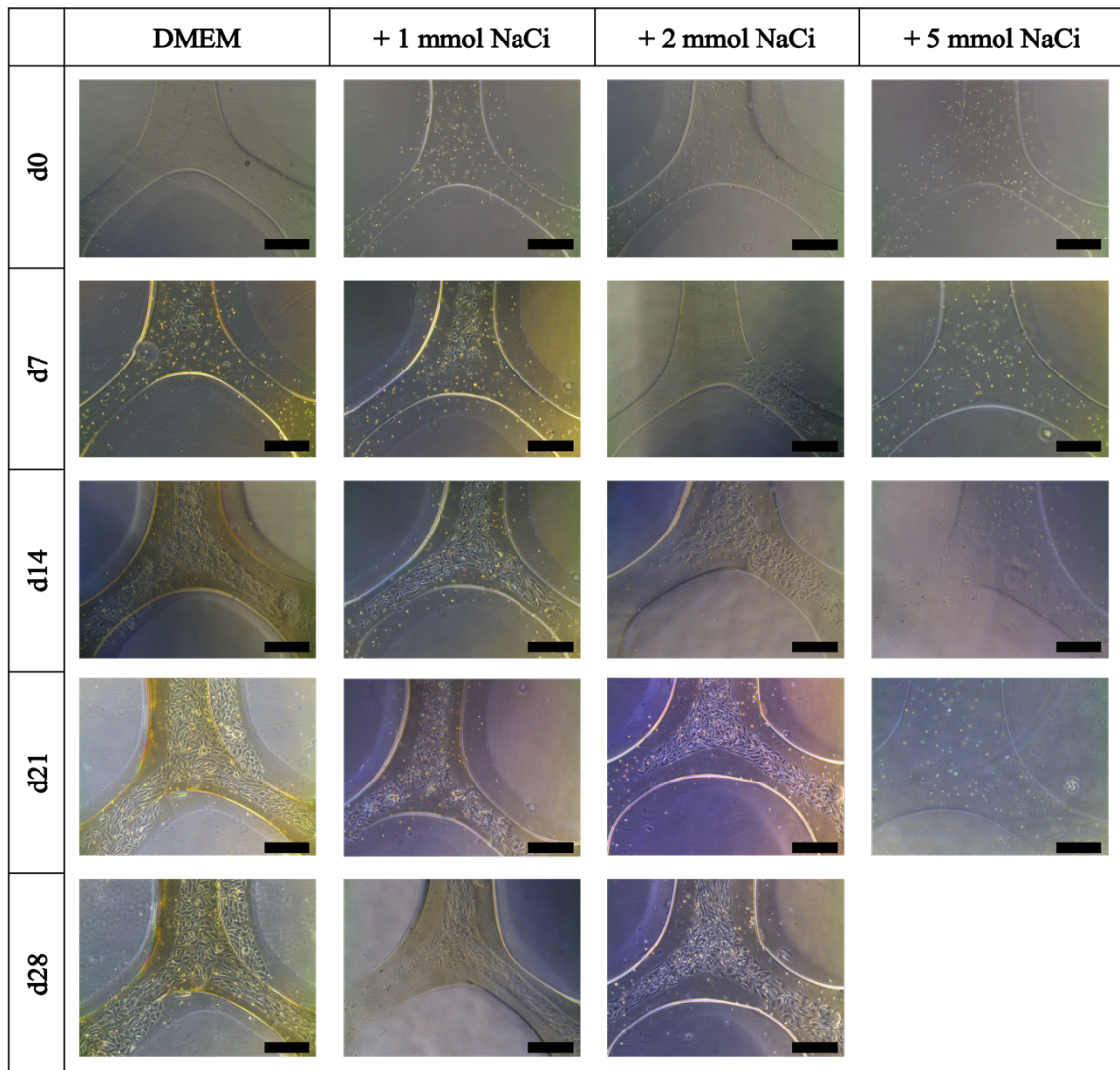


Abb. 22: Es wurden zu den Zeiten d0, d7, d14, d21 und d28 repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von Zelldrucken mit zwei Schichten gefertigt. Es wurde Alginat/Gelatine-Hydrogel verwendet und dieses in Medium inkubiert. Zusätzlich wurde in drei Versuchsreihen Natriumcitrat in einer Konzentration von 1 mmol, 2mmol und 5 mmol hinzugegeben. Abkürzungen: d – Tag; mmol – Millimol; DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; NaCi – Natriumcitrat. Maßstab $\cong 500 \mu\text{m}$.

Die Abbildung 23 zeigt die lichtmikroskopischen Aufnahmen der komplementären Drucke mit fünf Schichten. Sie wurden identisch behandelt. Ab d14 sind einzelne Proliferationsnester bei DMEM sowie mit zusätzlich 1 und 2 mmol Natriumcitrat zu sehen. Zu späteren Zeitpunkten füllen sie die ganzen Stränge. Bei einer Konzentration von 5 mmol waren keine Zellproliferation zu beobachten. Nach d28 waren noch alle Drucke für DMEM allein sowie für 1 und 2 mmol vorhanden. Bei einer Konzentration von 5 mmol hat sich ein Druck aufgelöst.

ABBILDUNG 23: EINFLUSS VON NATRIUMCITRAT (5 SCHICHTEN)

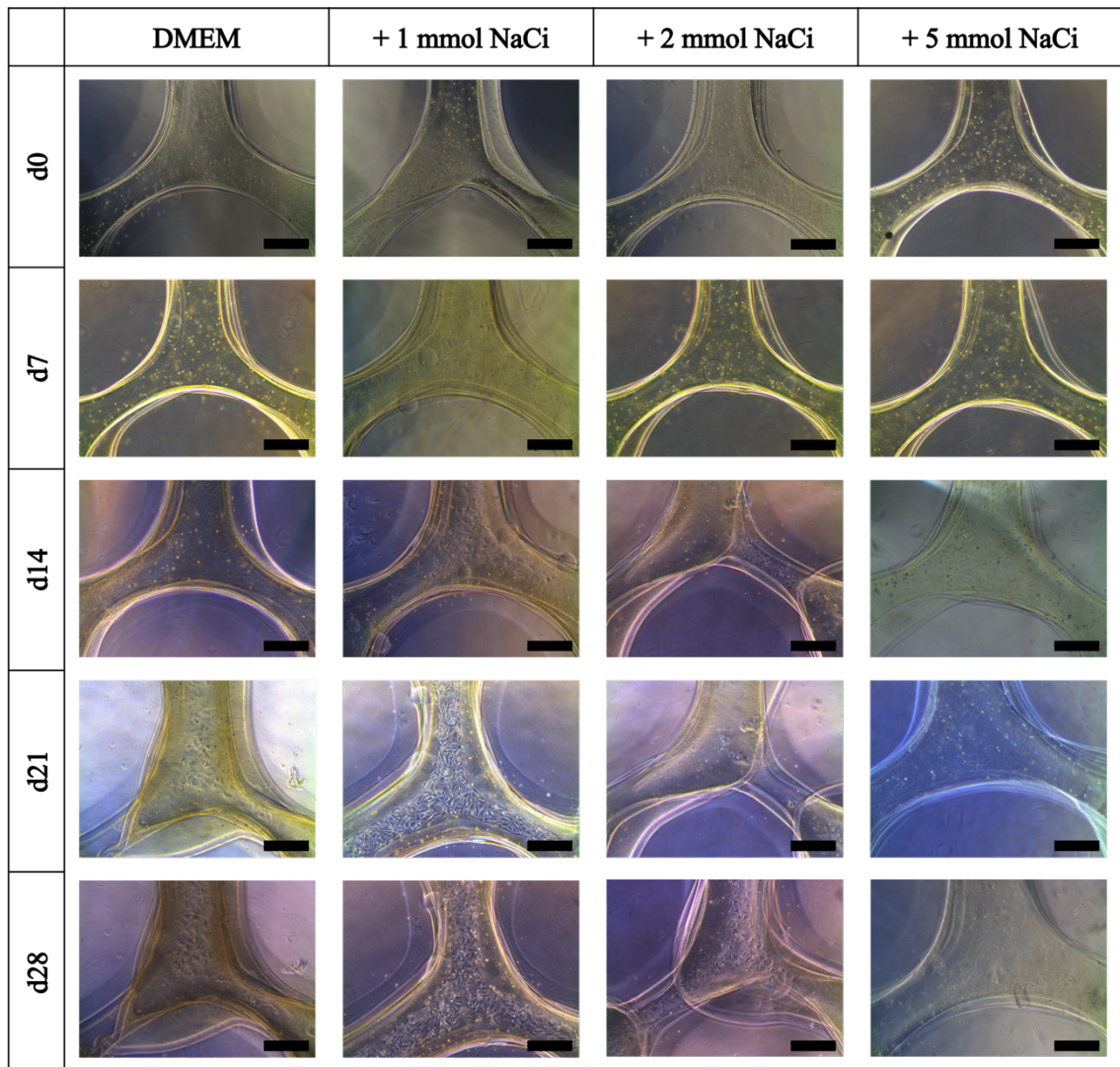


Abb. 23: Es wurden zu den Zeiten d0, d7, d14, d21 und d28 repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von Zelldrucken mit fünf Schichten gefertigt. Es wurde Alginat/Gelatine-Hydrogel verwendet und dieses in Medium inkubiert. Zusätzlich wurde in drei Versuchsreihen Natriumcitrat in einer Konzentration von 1 mmol, 2mmol und 5 mmol hinzugegeben. Abkürzungen: d – Tag; mmol – Millimol; DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; NaCi – Natriumcitrat. Maßstab \cong 500 μ m.

Nach einer Inkubation von 28 Tagen wurde zur Beurteilung der relativen Zellviabilität ein CCK-8-Assay durchgeführt. In Abbildung 24 sind links die Ergebnisse der zweischichtigen Drucke dargestellt. Die relative Zellviabilität sinkt mit Höhe der Konzentration von Natriumcitrat (DMEM: $M = 1,00$, $SD = 0,15$, $SE = 0,05$; DMEM + 1 mmol NaCi: $M = 0,77$, $SD = 0,17$, $SE = 0,058$); DMEM + 2 mmol NaCi: $M = 0,756$, $SD = 0,07$, $SE = 0,026$). Dabei zeigt DMEM im Vergleich zu 1 mmol ($p = 0,0201$) sowie zu 2 mmol Natriumcitrat ($p = 0,0193$) einen signifikanten Unterschied. Rechts in Abb. 24 sind die

Ergebnisse für die fünfschichtigen Drucke dargestellt inklusive der Inkubation mit 5 mmol Natriumcitrat. Auch hier nimmt die Zellviabilität mit der Konzentration von Natriumcitrat ab (DMEM: M = 1, SD = 0,042; SE = 0,024; DMEM + 1 mmol NaCi: M = 0,99, SD = 0,16, SE = 0,09; DMEM + 2 mmol NaCi: M = 0,85, SD = 0,055, SE = 0,032; DMEM + 5 mmol NaCi: M = 0,59, SD = 0,03, SE = 0,021). Die Unterschiede sind nicht signifikant.

ABBILDUNG 24: EINFLUSS VON NATRIUMCITRAT AUF ZELLVIABILITÄT

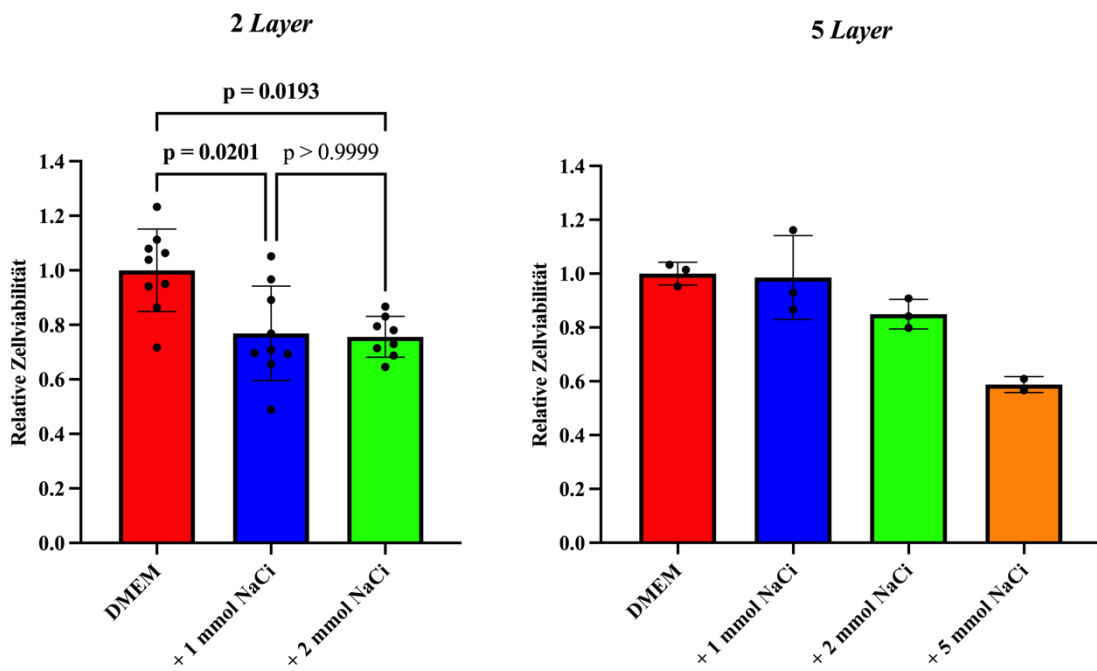


Abb. 24: Links: CCK-8-Assay von Zweischichtdrucken mit Inkubation von jeweils DMEM +/- 1 mmol, 2 mmol oder 5 mmol Natriumcitrat zu d28; Rechts: CCK-8-Assay von Mehrschichtdrucken (5 Schichten) mit Inkubation von jeweils DMEM +/- 1 mmol, 2 mmol oder 5 mmol Natriumcitrat zu d28; Abkürzungen: DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; NaCi – Natriumcitrat; mmol – Millimol.

3.4 Vergleich von Zelldrucken mit VIC in dezellularisierter ECM und artifizieller ECM zum Standardhydrogel

Das in den vorherigen Versuchen benutzte Alginat-/Gelatine-Hydrogel auf Basis von DMEM wird nun als Standardhydrogel definiert. Dieses wurde mit Hydrogel aus dezell-

lularisierter und artifizierter extrazellulärer Matrix verglichen. Alle drei Hydrogele wurden unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die lichtmikroskopischen Ergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt. In dem dECM-Hydrogel sind kleine, nicht verdaute Aortenklappenbestandteile im Hydrogel sichtbar. Die Zellen (VIC) sind in allen Strängen sichtbar. Im Standardhydrogel sind ab d7 Zellproliferationen zu sehen (siehe Pfeil Abb. 25). Diese sind teilweise aus dem Strang ausgebrochen, ab d14 nehmen sie auch den druckfreien Raum ein (siehe Kreis Abb. 25). In den Hydrogelen aus dECM und aECM sind lichtmikroskopisch keine Zellproliferationen zu sehen. Im Vergleich zum dECM-Hydrogel ist zu erkennen, dass mit dem Standardhydrogel deutlich präziser gedruckt werden konnte.

ABBILDUNG 25: dECM-HYDROGEL VS. aECM-HYDROGEL VS. STANDARD-HYDROGEL

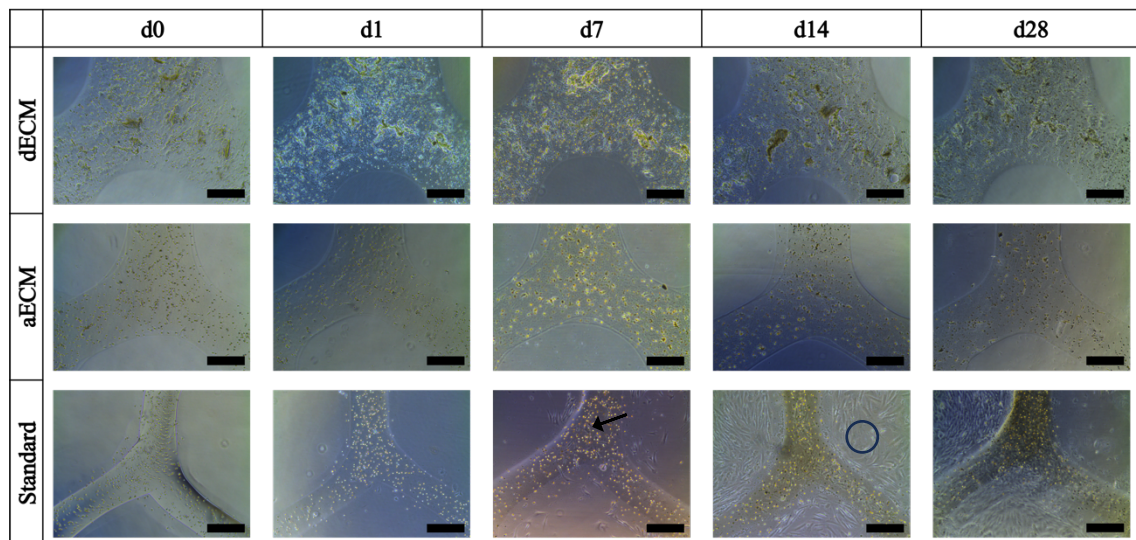


Abb. 25: Es wurden zu den Zeiten d0, d1, d7, d14 und d21 repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von Zelldrucken mit zwei Schichten gefertigt. Es wurden Alginat/Gelatine-Hydrogel (Standardhydrogel), dECM-Hydrogel und aECM-Hydrogel verglichen. Abkürzungen: d – Tag; dECM – dezellularisierte extrazelluläre Matrix; aECM – artifizierter extrazellulärer Matrix; Maßstab \cong 500 μ m.

Die Abbildung 26 zeigt die Auswertung mittels *Life-/Dead-Assay* ($n=5$), wie es auch in Immohr, dos Santos Adrego, et al. (2023) publiziert wurde. Mitte links ist der zeitliche Verlauf der *Life-/Dead-Ratio* zu d1 und zu d21 dargestellt. An d1 beträgt die Überlebensrate bei dem Standardhydrogel 0,8 (SD = 0,044, SE 0,02), bei dECM 0,25 (SD = 0,16, SE = 0,071) und bei aECM 0,54 (SD = 0,051, SE = 0,023). Dabei steigt zu d21 bei dem Standardhydrogel ($M = 0,89$, SD = 0,034, SE = 0,015) und dem Hydrogel aus aECM (M

= 0,81, SD = 0,085, SE = 0,038) die Ratio, bei aECM stärker und signifikant, an ($p < 0,0001$). Bei dem dECM-Hydrogel hingegen sinkt sie signifikant auf 0,054 (SD = 0,053, SE = 0,024) ($p = 0,0034$). In der Abbildung 26 oben sind die Überlebensraten zu d1 und d21 einzeln dar. Zu beiden Zeitpunkten ist der Unterschied zwischen dem Standardhydrogel und dem Hydrogel aus dECM signifikant ($p = 0,002$). Die anderen Beziehungen sind unabhängig von den Zeitpunkten nicht signifikant. Abbildung 26 zeigt die digitalen Korrelate der Life-/Dead-Assays zu den beiden Zeitpunkten.

Zudem wurde zusätzlich ein CCK-8-Assay zur Beurteilung der relativen Zellviabilität durchgeführt. Dabei zeigten sich zu d21 die gleiche Reihenfolge, wie beim Life-Dead-Assay. Das Standardhydrogel hatte die höchste Zellviabilität (M = 0,16, SD = 0,073, SE = 0,021), gefolgt von dem aECM-Hydrogel (M = 0,11, SD = 0,022, SE = 0,0063) sowie dem dECM-Hydrogel (M = 0,091, SD = 0,027, SE = 0,0077). Auch hier war nur der Unterschied vom dem Standardhydrogel zu dem dECM-Hydrogel signifikant ($p = 0,003$).

ABBILDUNG 26: VERGLEICH STANDARDHYDROGEL VS. DECM VS. AECM

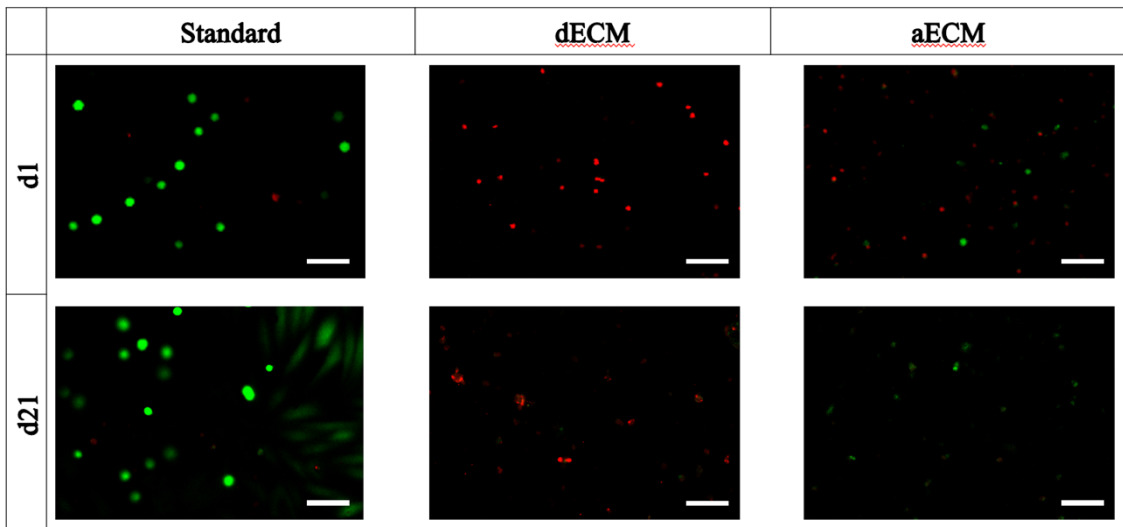
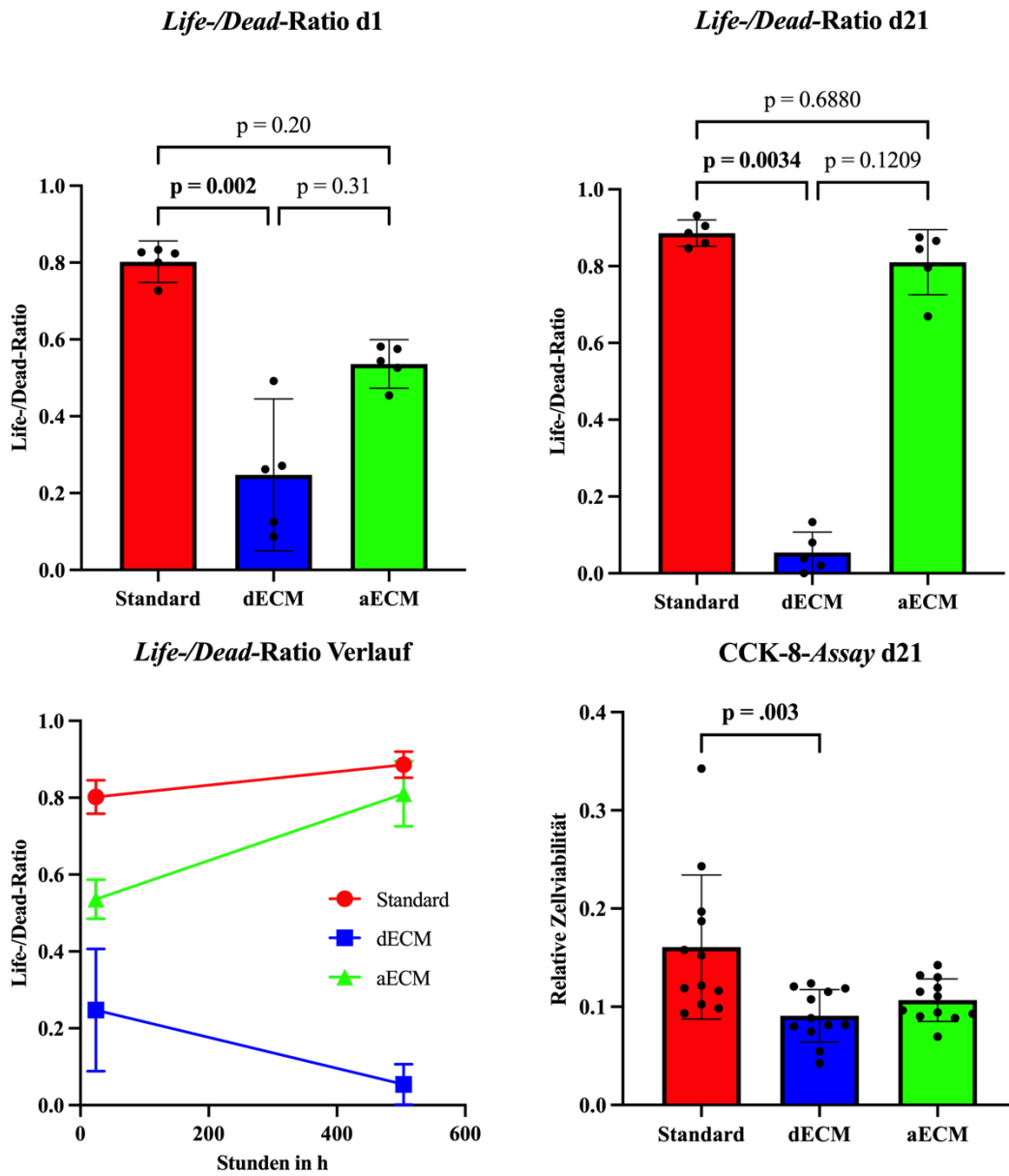


Abb. 26: Oben links: Life-/Dead-Ratio von Standardhydrogel, dECM-Hydrogel und aECM-Hydrogel zu d1. Oben rechts: Life-/Dead-Ratio von Standardhydrogel, dECM-Hydrogel und aECM-Hydrogel zu d21. Dabei werden lebendige Zellen grün gefärbt (Calcein-AM) und tote Zellen rot (Ethidiumhomodimer). Mitte links: Verlauf Life-/Dead-Ratio von Standardhydrogel, dECM-Hydrogel und aECM-Hydrogel zu d1 und d21. Mitte rechts: CCK-8-*Assay* von Standardhydrogel, dECM-Hydrogel und aECM-Hydrogel zu d21. Abkürzungen: d – Tag; dECM – dezellularisierte extrazelluläre Matrix; aECM – artifizielle extrazelluläre Matrix. $\cong 200 \mu\text{m}$.

4 DISKUSSION

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache in der heutigen Gesellschaft dar und teilen sich in ihrer Pathogenese krankheitsrelevante Risikofaktoren (Roth et al., 2020). Darunter sind Herzklappenerkrankungen, mit der Aortenklappenstenose als häufigste und damit relevanteste Herzklappenpathologie, häufig (Lindman et al., 2016). Aufgrund des demographischen Wandels wird mit einer signifikanten Steigerung der Prävalenz gerechnet, sodass die Aortenklappenstenose, die einen bedeutenden ökonomischen Einfluss auf das Gesundheitssystem bereits jetzt darstellt, diesen zunehmend noch weiter steigern wird (Danielsen et al., 2014). Bis dato stellt die chirurgische oder interventionelle Therapie bislang die einzige Möglichkeit zur Verbesserung der Lebensqualität und Lebenszeitverlängerung dar. Pharmakologische Therapiemöglichkeiten zur Symptomlinderung und Progressionsverhinderung sind nicht vorhanden oder erst in den Anfängen ihrer Entwicklung (Donato et al., 2020). Trotz jahrelanger Forschung der Ursachen der CAVD sind die zugrundeliegenden Pathomechanismen und möglichen pharmakologischen Interventionsmöglichkeiten nur in Teilen erforscht. Daher sind Krankheitsmodelle der CAVD notwendig, um diese Prozesse anzutreiben.

Die bis dato vorherrschenden zweidimensionalen Krankheitsmodelle mangeln jedoch an der Nachbildung der Komplexität der Aortenklappe. 2D- und 3D-Zellkulturen unterscheiden sich in der Modellierung physiologischer Prozesse. Dabei bietet das extrusionsbasierte 3D-Bioprinting eine seit einigen Jahren zunehmende Möglichkeit komplexe Krankheitsmodelle zu entwickeln. Die vorhandene Erfahrung und Evidenzsammlung mit solchen dreidimensional gedruckten Modellen ist jedoch begrenzt und fokussiert sich in der aktuellen Literatur maßgeblich auf das möglichst zellstressfreie Drucken. Daher besteht vor jeder Etablierung eines Krankheitsmodells durch dreidimensionales Drucken, die Beurteilung der Zellviabilität an erster Stelle, um langlebige 3D-Kulturen zu generieren, bevor im Nachgang weitere Eigenschaften wie beispielsweise die Differenzierung oder die Untersuchung pharmakologischer Targets untersucht werden. Zur Optimierung der Zellviabilität wurden daher die unterschiedlichen Einflussfaktoren des Druckprozesses sowie des verwendeten Hydrogels inklusive dessen Eigenschaften untersucht. In Bezug zur Aortenklappe muss die Zellviabilität der valvulären Interstitialzellen sowie der valvulären Endothelzellen betrachtet werden (Immohr, Teichert, et al., 2023). Aufgrund der aus der Erfahrung heraus stressresistenteren valvulären Interstitialzellen wurde zunächst

die Viabilität dieser Zellen untersucht, um in nachfolgenden, nicht Bestandteil dieser Arbeit bestehenden Untersuchungen, die bereits gesammelten Erkenntnisse auf die vulnerableren Endothelzellen zu übertragen.

Während 2D-Kulturen standardmäßig in den meisten Laboren verwendet werden, bieten 3D-Kulturen eine realistischere Nachbildung der *in vivo* Umgebung. Im Vergleich zur herkömmlichen 2D-Zellkultur ist die 3D-Zellkultur wesentlich komplexer, was den Abbau des Hydrogels, die ECM-Produktion, die Zellanhaftung und die Migration anlangt (Duval et al., 2017). Während in 2D-Kulturschalen die Zellen an der Oberfläche der Kulturschale haften, muss sich das Hydrogel in einem 3D-Hydrogelgerüst teilweise auflösen, um ausreichend Platz für die Matrixproduktion und die Zellteilung zu schaffen. 3D-Zellkulturen fördern nicht nur verbesserte Zellfunktionen und -differenzierungen, sondern können auch die Zellmigration und die Matrixproduktion realistischer nachbilden. Allerdings gibt es im Vergleich zu 2D-Kulturen Nachteile, wie die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung, was wiederum die Zellphysiologie beeinflusst (Duval et al., 2017). Die Verwendung eines DMEM-basierten Hydrogels könnte ein wichtiger Faktor zur Lösung dieses Problems gewesen sein (Immohr et al., 2022). Da jedoch die beobachtete positive Wirkung von DMEM bei einschichtigen Gerüsten stärker ausgeprägt war als bei mehrschichtigen, bleibt die ausreichende Nährstoffdiffusion ein Problem. Deutlich wird dies bei dem Vergleich der Einzel- und Doppelsträngen mit den 15-Schichtigen Drucken. Im Gegensatz zu Ersteren, bei denen bereits an d7 Zellproliferationen lichtmikroskopisch zu erkennen waren, war dies bei den 15-Schichtigen Konstrukten auch zu d28 nicht der Fall. Nichtsdestotrotz ist ein Großteil zur jeweiligen Inkubationsperiode vital, wie die CCK8-Assays zeigen. Bei Betrachtung der Zellviabilität in Bezug auf das verwendete Druckmuster konnte gezeigt werden, dass die Gitterform zu signifikant besseren Zellviabilitäten führte als das Wabenmuster. Mitunter wird eine kleinere Porengröße durch die Wabenform im Vergleich zum Gitter die Versorgung der Zellen negativ beeinflussen. Diffusionsbeschränkungen könnten beispielsweise durch vaskularisierte Konduite gelöst werden, um die Verteilung von Nährstoffen zu verbessern, was wiederum einen komplexeren Druckvorgang mit sich zieht. Beispielhaft hat die Arbeitsgruppe um Skylar-Scott et al. (2019) innovative Techniken zur Vaskularisierung von 3D-gedruckten Konstrukten etabliert. Perfundierte 3D-Konstrukte zeigten eine verbesserte Zellviabilität sowie eine homogene Verteilung der lebenden Zellen, im Gegensatz zu nicht perfundierten und nur von außen versorgten 3D-Konstrukten. Dort entwickelte sich innerhalb von 12 Stunden ein

nekrotischer Kern im Inneren des Konstruktes. Trotz der Einschränkungen konnte auch in nicht perfundierten 3D-Modellen gezeigt werden, dass Zellen im 3D-Modell ein physiologischeres Verhalten in Bezug auf Migration und Matrixbildung zeigen (Duval et al., 2017). Die ideale Porengröße ist somit ein zentrales Element für die Zellbesiedlung und die mechanischen Eigenschaften des Konstruktes. Es hat sich gezeigt, dass größere Poren (größer als 200 μm) besser für die Zellmigration und Nährstoffdiffusion geeignet sind, während kleinere Poren (unter 100 μm) für stabilere mechanische Eigenschaften sorgen. Bei der Verwendung von Gelatine/Alginat-Hydrogelen wurde festgestellt, dass eine Pore von ca. 200 μm ein guter Kompromiss zwischen mechanischer Integrität und Zellinteraktion darstellt (Naghieh & Chen, 2021). In dieser Arbeit betrug die Porengröße durchweg immer über 500 μm , um den Fokus auf Zellversorgung zu garantieren. Weitere Herausforderungen von 3D-Kulturmethoden sind schließlich die Kosten und technischen Anforderungen für die Entwicklung und Erhaltung von 3D-Konstrukten. Die Beschaffungsmöglichkeiten von gesundem, humanen Herzklappenmaterial sind stark begrenzt, sodass mit der seltenen Ressource mit Bedacht umgegangen werden muss. Bis zur vollständigen Etablierung eines humanen Krankheitsmodelles bieten xenogene Modelle eine kostengünstige und vorrätige Möglichkeit die geplanten Modelle fortschrittlicher und immer näher an der Realität zu gestalten.

Die idealen Druckparameter für das Alginat/Gelatine-Hydrogel wurden qualitativ ermittelt, um sowohl die Präzision als auch die Druckfähigkeit bei möglichst geringer Zellschädigung zu gewährleisten. Dies wurde zunächst ex ante mittels zellfreien Hydrogelen getestet bzw. im Labor neu implementiert. Die optimalen Druckparameter lagen bei einem Druck von 300 hPa, einer Düsengeschwindigkeit unter 20 mm/s (vgl. (Naghieh & Chen, 2021), einer Hydrogeltemperatur von 34 °C und eine Plattformtemperatur von 5°C (Immohr et al., 2022). Aufgrund von wechselnder Luftfeuchtigkeit oder Raumtemperatur musste selten nur graduell nachgesteuert werden. Ein zentraler Punkt bei der Bewertung der Druckqualität ist die Druckfähigkeit, im Englischen *Printability* genannt, die die Fähigkeit beschreibt, stabile und reproduzierbare 3D-Gerüste aus Hydrogelen herzustellen. Nach Naghieh and Chen (2021) gibt es drei Faktoren, die die Druckbarkeit beeinflussen. Zum einen das Design des geplanten Konstruktes (Porengröße, Fadenorientierung, Schichtdicke), das Hydrogel (Zusammensetzung, Fließverhalten) und der Druckprozess (Druck, Geschwindigkeit, Crosslinking). Die Beurteilung der Strukturtreue, des Faden-

durchmessers, der Porengröße und der Oberflächenrauheit können Messgrößen zur Beurteilung der Druckfähigkeit sein. Nach Fu et al. (2021) sind Extrudierbarkeit (*Extrudability*), die Fähigkeit des Hydrogels kontrolliert durch die Dosiernadel extrudiert zu werden, die Fadentreue (*Filament Fidelity*), die Fähigkeit des Hydrogels nach dem Druck die Form zu halten, und die strukturelle Integrität (*Structural Integrity*), die Fähigkeit des gesamten 3D-Konstruktes stabil zu bleiben und sich nicht zu deformieren, Eigenschaften die Druckfähigkeit zu beurteilen. In dieser Arbeit wurde auf eine genaue quantitative Analyse der zuletzt genannten Messgrößen verzichtet, da bereits durch Vorversuche die idealen Druckparameter für den verwendeten Drucker festgestellt wurden und qualitativ gute Ergebnisse erzielt werden konnten. Da der Hauptfokus die Etablierung eines Erkrankungsmodells ist, ist die Druckfähigkeit und die Präzision zunächst zweitrangig, sondern die Stabilität der Konstrukte von Bedeutung. Dass jedoch trotzdem präzise, druckfähige und mehrschichtige Strukturen mit unseren Parametern erstellt werden konnten, zeigen die Miniaturmodelle der Aortenklappe.

Bei den zellfreien Drucken zeigte sich, dass das Hydrogel, wenn es mit DMEM hergestellt wurde, die qualitativ präzisesten Strukturen hervorbrachte. Vor den Zellversuchen war dies ein erfreuliches Ergebnis, denn nach theoretischen Überlegungen sollten die Zellen in einer Umgebung mit Mikronährstoffen, wie sie im DMEM enthalten sind, verbesserte Überlebenschancen haben. Nach unseren Literaturrecherchen wurde bis dato kein DMEM zur Auflösung der Hydrogelkomponenten verwendet. Kochsalzlösung 0,5% hatte die beste Stabilität der Drucke. In der Literatur wird meistens isotonische Kochsalzlösung oder destilliertes Wasser verwendet (Gardin et al., 2020; He et al., 2016). Bezüglich der Druckmuster ist zunächst entscheidend, wie viele Schichten gedruckt werden. Auch wenn die Stabilität einiger Lösungsmittel in den Einzelsträngen nicht ausreichend erschien, konnten alle Lösungsmittel im Gitterstrang zufriedenstellende Ergebnisse liefern. Vergleicht man nun das Gitter mit 2 Schichten mit dem Waben- oder dem ZigZag-Muster, so kann konstatiert werden, dass sowohl die Gitterstruktur und das Wabenmuster zufriedenstellende und präzise Ergebnisse liefert. Im Gegensatz dazu führen schnelle Druckkopfbewegungen, wie es bei dem ZigZag-Muster der Fall war zu unpräzisen Ergebnissen. Dies gilt in diesem Kontext für die zellfreien Drucke. Wie bereits weiter oben ausgeführt spielen bei Zelldrucken die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff eine entscheidende Rolle, ergo die Porengröße, sodass nach Durchführung aller

Versuche eine deutliche Empfehlung zur Gitterstruktur ausgesprochen werden kann. Unterstützt wird dies durch die Ergebnisse von Naghieh and Chen (2021), welche durch die rechtwinklige Orientierung der Stränge eine gleichmäßige Verteilung der Lasten innerhalb der Struktur und eine Minimierung der Verformungstendenz feststellten. Das hexagonale Wabenmuster ist durch die geometrische Anordnung für Strukturen mit hoher mechanischer Belastung geeignet. Das Gitter ist im Vergleich zum Wabenmuster also eher geeignet für mechanisch weniger anspruchsvolle Anwendungen oder für Gerüste, bei denen die Zellmigration und Nährstoffdiffusion durch große Poren gefördert werden soll. Bei den 15-Schichtigen Zelldrucken wurden das Gitter- und Wabenmuster verglichen, wobei statistisch signifikante Unterschiede festgestellt wurden. Wie bereits oben diskutiert, wird die Nährstoffversorgung der Hauptgrund für das Ergebnis sein, wobei anzumerken ist, dass es sich um voluminöse Konstrukte handelte, weswegen der CCK-8 Assay im Vergleich der Hydrogelherstellung mit PBS oder DMEM keine signifikanten Ergebnisse, wie in anderen Versuchen zeigen konnte. Außerdem kommt es bei der Wabenform zu einer stetigen Richtungsänderung des Druckkopfes in 2 Ebenen, wobei sich der Druckkopf bei der Gitterstruktur hingegen bis auf die Wechselpositionen an den Rändern stetig linear fortbewegt, was zu einer Reduktion der Scherkräfte führte.

Bei dem Druckprozess mit Zellen bestehen multifaktorielle Einflussparameter auf den direkten und indirekten Zellschaden, welcher jedoch maßgeblich durch den Scherstress beim Druckvorgang verursacht wird (Boularaoui et al., 2020). Ebenfalls führen die Druck- und Temperaturunterschiede zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität (Adhikari et al., 2021; Blaeser et al., 2016; Ning et al., 2020). Die Optimierung von Hydrogelen für das 3D-Bioprinting ist also ein entscheidender Faktor für die Erhöhung der Lebensfähigkeit von Zellen (Adhikari et al., 2021). Mittlerweile wurde in der Literatur eine Vielzahl verschiedener Hydrogele für das extrusionsbasierte 3D-Bioprinting beschrieben (Adhikari et al., 2021; Gungor-Ozkerim et al., 2018). In dieser Arbeit wurden Alginate und Gelatine für die Herstellung von Hydrogelen verwendet, die häufig eingesetzt werden, da es sich um günstige und leicht zu handhabende Komponenten handelt. In diesem Zusammenhang sind Alginatkonzentrationen von 1%-5% und Gelatinekonzentrationen von 2%-10% weit verbreitet (Łabowska et al., 2021). Nach eigenen Untersuchungen wurden die besten Hydrogeleigenschaften bei einer Konzentration von 2 % Alginate und 8 % Gelatine beobachtet (Immohr et al., 2022), genau wie He et al. (2016). Die Kombination von Alginate und Gelatine in einem Hydrogel ermöglicht es, die Vorteile

beider Verbindungen zu kombinieren, ergo die Temperaturempfindlichkeit von Gelatine hinsichtlich der Gelierfähigkeit und die Fähigkeit der schnellen ionischen Vernetzung durch Alginat (Łabowska et al., 2021). In den letzten Jahren wurde über verschiedene Anpassungen der Alginat- und Gelatinekonzentrationen berichtet, um die Druckbarkeit und Haltbarkeit von 3D-gedruckten Gerüsten zu erhöhen. In diesem Zusammenhang stehen das Molekulargewicht, die Temperatur und die Konzentration im Mittelpunkt, da sie sich direkt auf die mechanischen Eigenschaften der gedruckten Gerüste und damit auch auf deren Genauigkeit und Haltbarkeit auswirken (Gao et al., 2018; Giuseppe et al., 2018; Łabowska et al., 2021). Neben diesen Anpassungen (Molekularstruktur, Konzentration, Temperatur und Vernetzung der Hydrogelkomponenten) können die Eigenschaften von Alginat/Gelatine-Hydrogelen durch die Zugabe zusätzlicher Additive wie Fibroin oder Agarose weiter verändert werden (Gong et al., 2021). Diese Grundsätze gelten auch für die meisten anderen Hydrogele für das 3D-Bioprinting (z. B. Kollagen, Fibroin, Matrigel, Gelatine-Methacryloyl) (Cui et al., 2020; Gungor-Ozkerim et al., 2018). In Bezug zur Druckfähigkeit ist die Viskosität eines Hydrogels eines der entscheidendsten Faktoren, worauf die Anpassungen des Hydrogels hinauslaufen. Eine höhere Viskosität des Hydrogels führt zu einer besseren Kontrolle über die Strangbildung und verbessert die Strukturtreue, birgt jedoch das Risiko, dass höhere Drücke erforderlich sind, was wiederum die Zellviabilität beeinträchtigt (Naghieh & Chen, 2021). Niedrigviskose Hydrogele haben eine bessere Zellkompatibilität, neigen jedoch dazu, während des Drucks zu zerfließen und die geplante Struktur nicht beizubehalten. Für Hydrogele mit Gelatine und Alginat liegt die optimale Viskosität in einem Bereich von 400 bis 3000 mm²/s. Diese Viskosität ermöglicht eine ausreichend gute Extrudierbarkeit bei gleichzeitigem Erhalt der strukturellen Integrität des Gerüsts (Naghieh & Chen, 2021). Die Autoren Fu et al. (2021) betonen, die *shear-thinning* Eigenschaft von Hydrogelen bei der Verwendung von Alginat und Gelatine. *Shear-thinning* beschreibt eine nicht-newtonsche Fließeigenschaft, bei der die Viskosität eines Materials mit steigender Scherkraft abnimmt. In diesem Fall kann das Hydrogel durch die Dosiernadel leichter extrudiert werden. Nach dem Extrudieren gewinnt das Material seine ursprüngliche Viskosität zurück und bleibt stabil in der gedruckten Form. Weitere *shear-thinning* Hydrogele bestehen aus Hyaluronsäure, Chitosan und Fibrinogen, wobei sie oft mit synthetischen Polymeren kombiniert werden, um die mechanischen und rheologischen Eigenschaften zu optimieren (Fu et al., 2021).

Der Vernetzungsprozess nach dem Druck ist ebenfalls entscheidend für die Stabilität des gedruckten Gerüsts. Wie in dieser Arbeit auch werden Hydrogele mit Alginateanteil typischerweise durch die Zugabe von Calciumchlorid (CaCl_2) vernetzt, was zur Verfestigung führt. Es wurde sich für einen Zeitraum von 5 Minuten entschieden, da dadurch einerseits ein ausreichend stabiles Ergebnis, auf der andere Seite eine zu lange Exposition des zytotoxischen Calciumchlorids vermieden werden konnte (Cao et al., 2012).

In unseren Experimenten benötigten die VIC mindestens sieben Tage, um die normalen Proliferationsmechanismen nach dem Druckvorgang wieder aufzunehmen (Immohr et al., 2022). Dies könnte einerseits auf den beim Druckvorgang entstehenden Zellstress, andererseits durch die unphysiologische Lage in einem Hydrogel aus Alginate und Gelatine, beruhen. Dennoch war die Lebensfähigkeit der VIC nach der Akklimatisierung im Hydrogelkonstrukt zufriedenstellend, wie CCK-8-Test und Life-/Dead-Assay zeigten. Selbst nach vier Wochen Inkubationszeit nach dem Druckprozess waren die VIC innerhalb der stabilen 3D-gedruckten Gerüste lebensfähig, was im Vergleich zu anderen Ansätzen deutlich länger ist (Duan et al., 2013; Duan et al., 2014; van der Valk et al., 2018). Das wohl wichtigste Ergebnis dieser Arbeit ist die Tatsache, dass DMEM-Hydrogele sowohl in der Lichtmikroskopie als auch im CCK-8-Assay sowie dem Life-Dead-Assay im Vergleich mit Kochsalzbasierten Hydrogelen überlegen waren, wie in Immohr et al. (2022) publiziert. Während vor allem die Ergebnisse der zweischichtigen Strukturen signifikant sind, zeigte der CCK-8-Test für die Mehrschichtdrucke (5) keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen DMEM- und kochsalzbasierten Hydrogelen. Dies könnte durch technische Aspekte des CCK-8-Tests beeinflusst worden sein, da die Substanzen des Tests durch intrazelluläre Dehydrogenasen umgewandelt werden und möglicherweise längere Inkubationszeiten erforderlich sind, damit das Substrat (d. h. CCK-8) dickere mehrschichtige Gerüste durchdringt. Ebenfalls gilt dies für die mehrschichtigen Konstrukte (5), die dem Life/Dead-Assay zugeführt wurden. Auch hier ist anzunehmen, dass eine längere Inkubationszeit aufgrund des größeren Volumens an Hydrogel notwendig ist. Die Zellkonzentration von zellbeladenen Hydrogelen, wie sie in bereits veröffentlichten Arbeiten verwendet wurde, liegt häufig zwischen 1×10^6 und 1×10^7 Zellen ml^{-1} (Łabowska et al., 2021). Im Vergleich dazu war es in diesen Versuchen möglich eine niedrige VIC-Konzentration aufgrund der verbesserten Lebensfähigkeit der Zellen in unseren Gerüsten durch das Auflösen von Alginate und Gelatine in DMEM anstelle der üblicherweise verwendeten Kochsalzlösung zu verwenden. DMEM wurde bereits in

anderen Arbeiten als bevorzugtes Kulturmedium für 3D-biologisch gedruckte Zellen verwendet, aber das Hydrogel wurde immer noch in destilliertem Wasser oder Kochsalzlösung hergestellt (Duarte Campos et al., 2015; Zhao et al., 2014). Zwei andere Gruppen haben DMEM-basierte Hydrogele für das 3D-Bioprinting von Fibroblasten oder mesenchymalen Stromazellen, aber nicht von VIC, verwendet, wobei die Konstrukte nur maximal sieben Tage lang inkubiert wurde, was keinen Einblick in die langfristige Lebensfähigkeit der Zellen ermöglicht (Aydin et al., 2020; Park et al., 2017). Bemerkenswert ist, dass keine dieser Arbeiten im Bereich der kardiovaskulären Forschung durchgeführt wurde (Aydin et al., 2020; Park et al., 2017). Im Gegensatz zu diesen Studien berichteten Duan et al. (2013) über das 3D-Bioprinting von VIC und glatten Muskelzellen in ein- (1,5 mm Höhe) und mehrschichtigen Konstrukten (8 mm Höhe) mit Hydrogelen auf Alginate- und Gelatinebasis sowie methacrylierter Hyaluronsäure und methacrylierter Gelatine, die in Kochsalzlösung oder destilliertem Wasser gelöst wurden, mit einer Kultivierungsdauer von maximal sieben Tagen. Schließlich berichteten van der Valk et al. (2018) über ein weiteres 3D-Bioprinting-Modell mit in destilliertem Wasser gelösten methacrylierten Gelatine-Hydrogelen, bei dem ein- und zweischichtige Gerüste (1,5 mm Höhe pro Schicht) bis zu 14 Tage lang kultiviert wurden. Beide Forschergruppen haben die allgemeine Durchführbarkeit des 3D-Bioprinting von VIC nachgewiesen, jedoch nicht im Detail die spezifischen Kultivierungsparameter untersucht, die zu einer Verbesserung der langfristigen Lebensfähigkeit der Zellen für zukünftige CAVD-Forschungsanwendungen führen.

Eine interessante Beobachtung in der Versuchsreihe war der deutliche Unterschied in der Zellviabilität, die durch die Wahl der Dosiernadeln beeinflusst wurde. Hierbei zeigten, zumindest für die 0,41 mm Dosiernadeln, konische Nadeln eine signifikant stärkere Zellschädigung im Vergleich zu zylindrischen bzw. präzisen Nadeln. Diese Ergebnisse stimmen nicht mit den Hypothesen über den Einfluss des erwarteten Scherstress auf die Zellen während des Druckprozesses überein. Die Hypothese war, dass die konische Form der Nadeln zu einer stetig zunehmenden und gleichmäßigeren Druckverteilung führt, was den Scherstress auf die Zellen reduziert. Im Gegensatz dazu, dass es bei den zylindrischen Dosiernadeln zu einer abrupten Zunahme des Scherstress führt, was sich wiederum negativ auf die Zellviabilität auswirkt. Durch Verwendung der präzisen Nadeln wird also die Zellviabilität nicht nur gesteigert, sondern es bietet sich die Möglichkeit deutlich präziser bei der Herstellung komplexer Zellkonstrukte zu drucken. Auch die Gruppe um

Reina-Romo et al. (2021) zeigte durch computerunterstützte Flussanalysen und Durchführung von Life/Dead-Assays, dass es bei konischen Düsen bei steigendem Druck, vor allem bei dickflüssigeren Hydrogelen, zu einem höheren Scherstress kommt im Vergleich zu zylindrischen Düsen mit aufgrund einer laminaren Strömung einhergehenden geringeren Scherbelastung, was zu einer signifikant geringeren Zellviabilität führt. Die optimalen Bedingungen seien demnach eine Kombination von niedrigem Druck, größeren Düsenrößen und laminaren Strömungsprofilen, die durch zylindrische Nadeln garantiert werden, was den Scherstress minimiert und die Druckqualität verbessert.

Ein weiteres zentrales Ergebnis dieser Arbeit war der Einfluss von Natriumcitrat auf die Zellviabilität. Die Zugabe von Natriumcitrat ermöglichte eine kontrollierte Degradation des Alginatanteils im Hydrogel, was jedoch die Langzeitstabilität der Zellgerüste negativ beeinflusste. Mit steigender Konzentration von Natriumcitrat sank die Zellviabilität signifikant. Dies war jedoch nur bei den zweischichtigen Konstrukten der Fall. Eine Erklärung könnte sein, dass trotz niedriger Dosierung des Natriumcitrates, die Konzentration im Verhältnis zu dem Hydrogel weiterhin zu hoch war, sodass es relativ betrachtet zu einem schnelleren Abbau des Hydrogels als die Produktion von ECM durch die Zelle stattfinden konnte. Dadurch kommt es zum Verlust der Hydrogelstruktur inklusive VIC, sodass das CCK-8-Assay eine insgesamt niedrigere Zellviabilität aufzeigt. Andere und zugleich erfreuliche Ergebnisse zeigte die Gruppe um Wu et al. (2016), die durch die Zugabe von Natriumcitrat die Zellproliferation um 15,4% signifikant im Vergleich zu unbehandelten Konstrukten zeigen konnte. Höhere Konzentrationen von Natriumcitrat führten zu einer schnelleren Degradation des Alginatkonstruktes, was auch in dieser Arbeit die Beobachtung war. Eine Erklärung, warum es zu diesen differenten Ergebnissen kommt, könnte zum einen die verwendete Zelllinie sein. In dem genannten Paper wurden murine NIH/3T3-Fibroblasten verwendet, die bekannt für ihr schnelles Wachstum sind. Weiterhinkönnte die additive Verwendung von Kollagen als Hydrogelbestandteil zu einem insgesamt stabileren Hydrogel geführt haben, sodass trotz der Degradation des Alginates ein zusätzlicher Bestandteil zur Festigkeit des Hydrogels beigetragen hat. Insgesamt sind die Ergebnisse relevant, da durch eine Änderung, ergo einer Reduzierung, der Natriumcitratkonzentration eine kontrollierte Degradation des hier verwendeten Hydrogels aus Alginat und Gelatine möglich ist, und perspektivisch so Gewebe aus eigener ECM durch Abbau des Hydrogels erwartet werden kann. Eine andere Strategie wählte die Gruppe um Barceló et al. (2022), welche Natriummetaperiodat (NaIO_4) verwendete,

was spezifisch die Glykolgruppen in der Struktur des Alginats oxidiert und zu einer Aufspaltung der Polymerketten führt. Es wurde dabei ein Knorpelmodell mit mesenchymalen Stammzellen (MSCs) verwendet, wobei eine chondrogene Differenzierung mit nachgewiesenen hohen Mengen an sulfatierten Glykosaminoglykanen (sGAG) und Kollagen Typ II werden konnte, was auf die Bildung von Knorpelgewebe hinweist. Auch hier nahm die mechanische Stabilität der Hydrogele mit zunehmendem Anteil von Natriummetaperiodat ab, was für eine gute Steuerbarkeit hinweist. Der Vorteil an diesem Verfahren ist, dass für eine bestimmte Menge Alginat eine spezifische Menge an Natriummetaperiodat hinzugegeben werden kann, was zum einen die Zellkultur wesentlich vereinfacht und zweitens zu einer deutlich besseren Berechenbarkeit als das von extern zugegebene Natriumcitrat führt.

Letztlich wurde das Standardhydrogel mit dezellularisierter und artifizieller extrazellulärer Matrix verglichen. Das Standardhydrogel zeigte die höchste Präzision und Zellproliferation im Vergleich zu den anderen getesteten Hydrogelen (dezellularisierte und artifizielle ECM), wobei sowohl im Life-Dead-Assay als auch im CCK8-Assay signifikante Ergebnisse im Vergleich zu dem dECM-Hydrogel bestanden. Eine interessante Beobachtung ist der zeitliche Verlauf der Zellviabilitäten. Wie bei jedem Druck kommt es allein durch den Vorgang zu erhöhtem Zellstress und einer Verminderung der vitalen Zellzahl. Diese steigt jedoch sowohl bei dem Standardhydrogel als auch beim aECM-Hydrogel, was darauf hinweist, dass sich die Zellen regenerieren und eine normale Zellproliferation aufnehmen. Im Gegensatz dazu ist bereits initial bei dem dECM-Hydrogel eine schlechte Überlebensrate festzustellen, die sich jedoch auch im Verlauf nicht bessert, im Gegenteil verschlechtert. Ein Grund könnte der inkomplette Verdau der VIC-ECM sein. In den lichtmikroskopischen Aufnahmen sind weiterhin mikroskopische Gewebebestandteile vorhanden, die zu erhöhten Scherkräften während der Extrusion führen, sodass es zu einer starken Reduktion der Zellviabilität kommt. Trotz dieser Tatsache wird auch das Mikromillau des Hydrogels eine Rolle spielen, da es im Verlauf nicht zu einer Steigerung, sondern einer Reduktion der Überlebensraten kam. Gründe könnten der pH-Wert sein nach dem Verdau des Hydrogelpulvers sein. Ein anderer Grund könnte durch die mechanisch nicht ganz zerkleinerten Klappen, ein Restbestandteil der Dezellularisierungslösung sein, die im Verlauf nach und nach abgegeben wird. In jedem Falle müssen die technischen Voraussetzungen der Pulverisierung verbessert werden, um ein ideales Hydrogel aus dECM herzustellen. Ein weiterer Grund ist die Geliereigenschaft von dECM. Umgekehrt

zu Gelatine und Alginat, welche bei niedrigen Temperaturen fest und bei Körpertemperatur viskos sind, ist dECM, ebenso wie die aECM, bei niedrigen Temperaturen viskos und wird bei Körpertemperatur fest. Die Gelierdauer beträgt sodann noch etwa 30 Minute, sodass selbst ein Druck mit einer Plattformtemperatur von 37°C nicht zu einer schnellen Gelierung führen würde. Insofern war in dieser Versuchsform die Zugabe von Alginat und Gelatine obligat, um eine Druckfähigkeit der dECM zu gewährleisten. Dies führt wiederum zu einem hoch viskosen Hydrogel, da bei 34°C Teile der dECM beginnen zu gelieren, was wiederum die Scherkräfte zusätzlich erhöht. Weiterhin könnten auch Interaktionen zwischen den beiden Hydrogelbestandteilen eine Rolle spielen, die den negativen Einfluss des Hydrogels auf die VIC erklärt. Nehrenheim et al. (2019), an dessen Protokoll sich orientiert wurde, zeigte einerseits die biochemische Zusammensetzung des dECM-Hydrogels auf (unter anderem Kollagen Typ I und Glykosaminoglykane (GAGs)), die für die Zellproliferation und Zelldifferenzierung essentiell sind. Weiterhin zeigte das dECM-Hydrogel keine zytotoxischen Effekte und unterstützte die Proliferation von VICs besser als in Matrigel oder Kollagen Typ I. Der Unterschied zu dieser Arbeit war jedoch, dass das Hydrogel in Mulden gegossen wurde, was die negativen Folgen des Druckvorganges umgeht. Eine Lösung beide Verfahren zu kombinieren wäre ein indirektes Bioprinting, wobei temporäre Stützstrukturen verwendet werden, um schwach vernetzte Hydrogele temporär stabil zu drucken (Fu et al., 2021). So könnte ein Stützgerüst gedruckt werden, in dem wiederum das dECM-Hydrogel mit kalt temperiertem Druckkopf gedruckt werden kann. Der Vorteil an dieser Methode im Vergleich zum reinen Gießen des Hydrogels in eine Form, ist die Möglichkeit der Etablierung von komplexen Gerüsten mit einer idealen Porengröße, um die Nährstoffversorgung der Zellen zu optimieren. Nach Gelierung des dECM-Hydrogels kann sodann die Stützstruktur temperaturabhängig oder chemisch aufgelöst werden. Alternativ bietet die Nutzung von Koaxialdruckköpfen eine weitere Möglichkeit zwei unterschiedliche Hydrogele gleichzeitig zu drucken, sodass Stützstruktur als auch dECM-Hydrogel gedruckt werden könnten. Dies bietet zudem die Möglichkeit permanentes und temporäres Hydrogel zu tauschen, sodass zentral ein temporäres Hydrogel gedruckt wird mit umgebendem permanentem Hydrogel, sodass Kanäle für eine mögliche Vaskularisierung verbleiben (Skylar-Scott et al., 2019). Obwohl diese Arbeit wertvolle Erkenntnisse über die Optimierung von Hydrogel- und Druckparametern für das 3D-Bioprinting von VIC liefert, gibt es einige Limitationen, die die Interpretation der Ergebnisse einschränken könnten. Ein zentraler Aspekt ist die in

vitro Natur der Studie. Die kultivierten VIC könnten im Verlauf der Experimente phänotypische Veränderungen durchlaufen haben, die von den in vivo Bedingungen abweichen. Insbesondere das Fehlen einer dynamischen, physiologischen Umgebung, wie sie beispielsweise in einem Bioreaktor simuliert werden könnte, schränkt die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf klinische Anwendungen ein. Zukünftige Studien könnten daher versuchen, die Ergebnisse durch die Verwendung von Bioreaktormodellen zu validieren, die die mechanischen und hämodynamischen Bedingungen eines lebenden Organismus besser nachbilden. Weiterhin wurde die Immunantwort eines Organismus bis jetzt nicht miteinbezogen, sodass weitere Ko-Kulturen mit Immunzellen oder tierexperimentelle Verfahren von Nutzen sein könnten. Eine weitere Limitation ist die fehlende Vaskularisierung der gedruckten Konstrukte, auch wenn es in der hier verwendeten Skalierung nicht unbedingt von starker Relevanz ist aufgrund einer groß gewählten Porengröße. Sollten jedoch komplexere Erkrankungsmodelle gedruckt werden, so wird eine Planung der Vaskularisierung unvermeidbar sein. Die Verwendung eines xenogenen Modelles stellte sich bei der Implementierung als Stärke dar, da es eine praktikable und günstige Alternative zu humanem Gewebe darstellt. Für die verbesserte Übertragbarkeit auf den Menschen müssen in Zukunft jedoch auch humane Zelllinien verwendet werden, was jedoch aufgrund der meist morbiden Spenderherzen zu Einschränkungen führen könnten. Weiterhin sollte der Fokus auf eine weitere Verbesserung des Standardhydrogels richten. Zwar wurden qualitative Ergebnisse zur Druckpräzision erzielt, aber quantitative Analysen mit Adjustierung des Designs, der Druckparameter und des Hydrogels könnten eine umfassendere Bewertung der Druckgenauigkeit und der Reproduzierbarkeit der Konstrukte gewährleisten. Beispielsweise könnten auch weitere Additive, wie in vorherigen Arbeiten aufgezeigt, verwendet werden, um das Hydrogel stetig zu verbessern. Unausweichlich ist die optimierte Pulverisierung der dECM, um einen optimalen Verdau zu gewährleisten. Wie bereits angesprochen gibt es Unterschiede zwischen VIC und VEC. In dieser Arbeit wurde sich auf die VIC konzentriert. Endothelzellen, die in späteren Versuchen verwendet werden sollen, könnten möglicherweise eine andere Reaktion auf die Druckparameter zeigen, da sie hypothetisch empfindlicher auf mechanischen Stress reagieren (Immohr, Teichert, et al., 2023).

4.1 Schlussfolgerungen

Die Aortenklappenstenose ist eine der häufigsten und relevantesten kardiovaskulären Erkrankungen, deren Prävalenz in der alternden Gesellschaft zunehmend ansteigt. Bisher existieren keine pharmakologischen Therapiemöglichkeiten zur Verlangsamung oder Verhinderung des Krankheitsverlaufs und die chirurgische Intervention bleibt die einzige langfristige Option. Um die Mechanismen der kalzifizierenden Aortenklappenerkrankung (CAVD) besser zu verstehen und neue Ansätze für pharmakologische Behandlungen zu entwickeln, sind präzise und komplexe Krankheitsmodelle notwendig. Die bisherigen zweidimensionalen Modelle sind in ihrer Fähigkeit, die komplexen physiologischen Prozesse der Aortenklappe nachzubilden, stark limitiert. Daher bietet das 3D-Bioprinting eine vielversprechende Technologie zur Entwicklung relevanter Erkrankungsmodelle, die physiologische Bedingungen besser nachahmen können.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von extrusionsbasiertem 3D-Bioprinting und DMEM-basierten Alginat/Gelatine-Hydrogelen unter optimierten Druckparametern eine signifikant verbesserte Zellviabilität und Proliferation von valvulären Interstitialzellen (VIC) mit Langlebigkeit erreicht werden konnte, wie auch in Immohr et al. (2022) publiziert. Ein entscheidender Faktor für den Erfolg war dabei die Wahl geeigneter Porengrößen und Druckmuster, insbesondere die Gitterstruktur, die im Vergleich zur Wabenstruktur eine verbesserte Nährstoffdiffusion ermöglichte. Zudem zeigte sich, dass die Wahl der Dosiernadel einen erheblichen Einfluss auf die Zellviabilität hatte: Während zylindrische Nadeln geringere Scherbelastungen auf die Zellen ausübten und zu besseren Überlebensraten führten, verursachten konische Nadeln eine signifikant stärkere Zellschädigung. Zudem wurde die kontrollierte Degradation des Alginateanteils im Hydrogel durch Natriumcitrat als Möglichkeit aufgezeigt, um die Zellgerüste langfristig durch Eigenproduktion von ECM zu stabilisieren. Ein weiteres zentrales Ergebnis der Arbeit war die Untersuchung der dezellularisierten extrazellulären Matrix (dECM) als Hydrogelkomponente. Obwohl dECM potenziell wertvolle bioaktive Eigenschaften zur Unterstützung der Zellproliferation und -differenzierung bietet, zeigten die Experimente, dass dECM-basierte Hydrogele in Kombination mit Alginat und Gelatine eine niedrigere Zellviabilität aufwiesen als das Standardhydrogel. Diese Beobachtungen werden auf unzureichende mechanische Eigenschaften der dECM und die unvollständige Aufbereitung der Matrix zurückgeführt, die während des Druckvorgangs zu erhöhten Scherkräften führten.

Trotz dieser Erfolge gibt es einige Limitationen, die die Aussagekraft der Ergebnisse einschränken. Da die Experimente unter in-vitro-Bedingungen stattfanden, ist die Übertragbarkeit auf in-vivo-Szenarien begrenzt. Insbesondere die fehlende vaskularisierte Struktur stellt eine Einschränkung dar, die bei komplexeren Krankheitsmodellen oder größeren Konstrukten berücksichtigt werden muss. Zukünftig könnte die Integration von Perfusionsnetzwerken oder die Verwendung von Koaxialdruckköpfen helfen, diese Problematik zu lösen. Weiterhin könnten die Ergebnisse durch die Verwendung von dynamischen Bioreaktoren validiert werden, um die mechanischen Belastungen und hämodynamischen Bedingungen eines lebenden Organismus nachzubilden. Auch die Untersuchung anderer Zelltypen, insbesondere valvulärer Endothelzellen (VEC), wird in zukünftigen Arbeiten erforderlich sein, da diese empfindlicher auf mechanischen Stress reagieren könnten als VIC (Immohr, Teichert, et al., 2023). Darüber hinaus sind Gen- und Proteinanalysen der gedruckten Zellen sowie der Hydrogele geplant, um die beteiligten zellulären Mechanismen zu untersuchen.

Zusammenfassend war das übergeordnete Ziel dieser Arbeit die Etablierung eines 3D-Erkrankungsmodells für die CAVD, das zukünftige Forschungsarbeiten unterstützen soll. Diese Arbeit konnte wichtige Impulse für die Weiterentwicklung von 3D-Bioprinting-Ansätzen in der Herzmedizin liefern, insbesondere für die Modellierung der CAVD. Die gewonnenen Erkenntnisse über die optimierten Druckparameter, die Rolle der Dosiernadeln und die Herausforderungen bei der Verwendung von dECM legen den Grundstein für zukünftige Forschungsarbeiten, die auf die Entwicklung biofunktioneller, patientenspezifischer Krankheitsmodelle abzielen. Diese Modelle könnten letztlich die Basis für die Untersuchung neuer pharmakologischer Therapien und deren Wirkung in physiologisch relevanten Umgebungen bieten.

5 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

- Adhikari, J., Roy, A., Das, A., Ghosh, M., Thomas, S., Sinha, A., Kim, J., & Saha, P. (2021). Effects of Processing Parameters of 3D Bioprinting on the Cellular Activity of Bioinks. *Macromol Biosci*, 21(1), e2000179. <https://doi.org/10.1002/mabi.202000179>
- Akinseye, O. A., Pathak, A., & Ibebuogu, U. N. (2018). Aortic Valve Regurgitation: A Comprehensive Review. *Curr Probl Cardiol*, 43(8), 315-334. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2017.10.004>
- Alushi, B., Curini, L., Christopher, M. R., Grubitzch, H., Landmesser, U., Amedei, A., & Lauten, A. (2020). Calcific Aortic Valve Disease-Natural History and Future Therapeutic Strategies. *Front Pharmacol*, 11, 685. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00685>
- Aumüller, G. (2017). *Duale Reihe Anatomie* (4. ed.). Georg Thieme Verlag.
- Aydin, L., Kucuk, S., & Kenar, H. (2020). A universal self-eroding sacrificial bioink that enables bioprinting at room temperature. *Polymers for Advanced Technologies*, 31(7), 1634-1647. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pat.4892>
- Barceló, X., Eichholz, K. F., Garcia, O., & Kelly, D. J. (2022). Tuning the Degradation Rate of Alginate-Based Bioinks for Bioprinting Functional Cartilage Tissue. *Biomedicines*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071621>
- Baumgartner, H., Falk, V., Bax, J. J., De Bonis, M., Hamm, C., Holm, P. J., Iung, B., Lancellotti, P., Lansac, E., Rodriguez Muñoz, D., Rosenhek, R., Sjögren, J., Tornos Mas, P., Vahanian, A., Walther, T., Wendler, O., Windecker, S., & Zamorano, J. L. (2017). 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J*, 38(36), 2739-2791. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx391>
- Beckmann, E., Grau, J. B., Sainger, R., Poggio, P., & Ferrari, G. (2010). Insights into the use of biomarkers in calcific aortic valve disease. *J Heart Valve Dis*, 19(4), 441-452.
- Benninghoff, A., & Drenckhahn, D. (2008). *Taschenbuch Anatomie*. Urban und Fischer.
- Bhandari, S., Yadav, V., Ishaq, A., Sanipini, S., Ekhtor, C., Khleif, R., Beheshtaein, A., Jhajj, L. K., Khan, A. W., Al Khalifa, A., Naseem, M. A., Bellegarde, S. B., & Nadeem, M. A. (2023). Trends and Challenges in the Development of 3D-Printed Heart Valves and Other Cardiac Implants: A Review of Current Advances. *Cureus*, 15(8), e43204. <https://doi.org/10.7759/cureus.43204>
- Bian, W., Wang, Z., Sun, C., & Zhang, D. M. (2021). Pathogenesis and Molecular Immune Mechanism of Calcified Aortic Valve Disease. *Front Cardiovasc Med*, 8, 765419. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.765419>
- Blaeser, A., Duarte Campos, D. F., Puster, U., Richtering, W., Stevens, M. M., & Fischer, H. (2016). Controlling Shear Stress in 3D Bioprinting is a Key Factor to Balance Printing Resolution and Stem Cell Integrity. *Adv Healthc Mater*, 5(3), 326-333. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500677>
- Boulaoui, S., Hussein, G., Khan, K., Christoforou, N., & Stefanini, C. (2020). An overview of extrusion-based bioprinting with a focus on induced shear stress and its effect on cell viability. *Bioprinting*, 20, e00093. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00093>
- Bowler, M. A., & Merryman, W. D. (2015). In vitro models of aortic valve calcification: solidifying a system. *Cardiovasc Pathol*, 24(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2014.08.003>

- Braverman, A. C., Güven, H., Beardslee, M. A., Makan, M., Kates, A. M., & Moon, M. R. (2005). The bicuspid aortic valve. *Curr Probl Cardiol*, 30(9), 470-522. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2005.06.002>
- Butcher, J. T., & Markwald, R. R. (2007). Valvulogenesis: the moving target. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 362(1484), 1489-1503. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2130>
- Cao, N., Chen, X. B., & Schreyer, D. J. (2012). Influence of Calcium Ions on Cell Survival and Proliferation in the Context of an Alginate Hydrogel. *International Scholarly Research Notices*, 2012(1), 516461. <https://doi.org/https://doi.org/10.5402/2012/516461>
- Chan, K. L., Teo, K., Dumesnil, J. G., Ni, A., & Tam, J. (2010). Effect of Lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: results of the aortic stenosis progression observation: measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial. *Circulation*, 121(2), 306-314. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.109.900027>
- Christensen, L. K. (1955). Concerning the pH optimum of peptic hydrolysis. *Arch Biochem Biophys*, 57(1), 163-173. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(55\)90189-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(55)90189-2)
- Clark, M. A., Arnold, S. V., Duhay, F. G., Thompson, A. K., Keyes, M. J., Svensson, L. G., Bonow, R. O., Stockwell, B. T., & Cohen, D. J. (2012). Five-year clinical and economic outcomes among patients with medically managed severe aortic stenosis: results from a Medicare claims analysis. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*, 5(5), 697-704. <https://doi.org/10.1161/circoutcomes.112.966002>
- Coffey, S., Cox, B., & Williams, M. J. (2014). The prevalence, incidence, progression, and risks of aortic valve sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*, 63(25 Pt A), 2852-2861. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.04.018>
- Cui, X., Li, J., Hartanto, Y., Durham, M., Tang, J., Zhang, H., Hooper, G., Lim, K., & Woodfield, T. (2020). Advances in Extrusion 3D Bioprinting: A Focus on Multicomponent Hydrogel-Based Bioinks. *Adv Healthc Mater*, 9(15), e1901648. <https://doi.org/10.1002/adhm.201901648>
- Danielsen, R., Aspelund, T., Harris, T. B., & Gudnason, V. (2014). The prevalence of aortic stenosis in the elderly in Iceland and predictions for the coming decades: the AGES-Reykjavík study. *Int J Cardiol*, 176(3), 916-922. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.08.053>
- Di Vito, A., Donato, A., Presta, I., Mancuso, T., Brunetti, F. S., Mastroroberto, P., Amorosi, A., Malara, N., & Donato, G. (2021). Extracellular Matrix in Calcific Aortic Valve Disease: Architecture, Dynamic and Perspectives. *Int J Mol Sci*, 22(2). <https://doi.org/10.3390/ijms22020913>
- Donato, G., Conforti, F., Camastra, C., Ammendola, M., Donato, A., & Renzulli, A. (2014). The role of mast cell tryptases in cardiac myxoma: Histogenesis and development of a challenging tumor. *Oncol Lett*, 8(1), 379-383. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2104>
- Donato, M., Ferri, N., Lupo, M. G., Faggin, E., & Rattazzi, M. (2020). Current Evidence and Future Perspectives on Pharmacological Treatment of Calcific Aortic Valve Stenosis. *Int J Mol Sci*, 21(21). <https://doi.org/10.3390/ijms21218263>
- Duan, B., Hockaday, L. A., Kang, K. H., & Butcher, J. T. (2013). 3D Bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101A(5), 1255-1264. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jbm.a.34420>

- Duan, B., Kapetanovic, E., Hockaday, L. A., & Butcher, J. T. (2014). Three-dimensional printed trileaflet valve conduits using biological hydrogels and human valve interstitial cells. *Acta Biomater*, *10*(5), 1836-1846. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.005>
- Duarte Campos, D. F., Blaeser, A., Korsten, A., Neuss, S., Jäkel, J., Vogt, M., & Fischer, H. (2015). The stiffness and structure of three-dimensional printed hydrogels direct the differentiation of mesenchymal stromal cells toward adipogenic and osteogenic lineages. *Tissue engineering. Part A*, *21*(3-4), 740-756. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2014.0231>
- Duval, K., Grover, H., Han, L. H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J., & Chen, Z. (2017). Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)*, *32*(4), 266-277. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>
- Fan, Y., Wong, R. H. L., & Lee, A. P. (2019). Three-dimensional printing in structural heart disease and intervention. *Ann Transl Med*, *7*(20), 579. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.09.73>
- Fu, Z., Naghieh, S., Xu, C., Wang, C., Sun, W., & Chen, X. (2021). Printability in extrusion bioprinting. *Biofabrication*, *13*(3). <https://doi.org/10.1088/1758-5090/abe7ab>
- Ganguli, A., Pagan-Diaz, G. J., Grant, L., Cvetkovic, C., Bramlet, M., Vozenilek, J., Kesavadas, T., & Bashir, R. (2018). 3D printing for preoperative planning and surgical training: a review. *Biomed Microdevices*, *20*(3), 65. <https://doi.org/10.1007/s10544-018-0301-9>
- Gao, T., Gillispie, G. J., Copus, J. S., Pr, A. K., Seol, Y. J., Atala, A., Yoo, J. J., & Lee, S. J. (2018). Optimization of gelatin-alginate composite bioink printability using rheological parameters: a systematic approach. *Biofabrication*, *10*(3), 034106. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aacdc7>
- Gardin, C., Ferroni, L., Latremouille, C., Chachques, J. C., Mitrečić, D., & Zavan, B. (2020). Recent Applications of Three Dimensional Printing in Cardiovascular Medicine. *Cells*, *9*(3). <https://doi.org/10.3390/cells9030742>
- Giannopoulos, A. A., Mitsouras, D., Yoo, S. J., Liu, P. P., Chatzizisis, Y. S., & Rybicki, F. J. (2016). Applications of 3D printing in cardiovascular diseases. *Nat Rev Cardiol*, *13*(12), 701-718. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.170>
- Giuseppe, M. D., Law, N., Webb, B., R, A. M., Liew, L. J., Sercombe, T. B., Dilley, R. J., & Doyle, B. J. (2018). Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting. *J Mech Behav Biomed Mater*, *79*, 150-157. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.12.018>
- Gong, C., Kong, Z., & Wang, X. (2021). The Effect of Agarose on 3D Bioprinting. *Polymers (Basel)*, *13*(22). <https://doi.org/10.3390/polym13224028>
- Gungor-Ozkerim, P. S., Inci, I., Zhang, Y. S., Khademhosseini, A., & Dokmeci, M. R. (2018). Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomater Sci*, *6*(5), 915-946. <https://doi.org/10.1039/c7bm00765e>
- Hadeed, K., Acar, P., Dulac, Y., Cuttone, F., Alacoque, X., & Karsenty, C. (2018). Cardiac 3D printing for better understanding of congenital heart disease. *Arch Cardiovasc Dis*, *111*(1), 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2017.10.001>
- Haycock, J. W. (2011). 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. *Methods Mol Biol*, *695*, 1-15. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0_1
- He, Y., Yang, F., Zhao, H., Gao, Q., Xia, B., & Fu, J. (2016). Research on the printability of hydrogels in 3D bioprinting. *Sci Rep*, *6*, 29977. <https://doi.org/10.1038/srep29977>
- Herold, G. (2020). *Innere Medizin 2020*. Gerd Herold.

- Hjortnaes, J., Goettsch, C., Hutcheson, J. D., Camci-Unal, G., Lax, L., Scherer, K., Body, S., Schoen, F. J., Kluin, J., Khademhosseini, A., & Aikawa, E. (2016). Simulation of early calcific aortic valve disease in a 3D platform: A role for myofibroblast differentiation. *J Mol Cell Cardiol*, *94*, 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.03.004>
- Immohr, M. B., dos Santos Adrego, F., Teichert, H. L., Schmidt, V., Barth, M., Sugimura, Y., Lichtenberg, A., & Akhyari, P. (2023). Development and Comparison of Native Extracellular Matrix-Derived Hydrogels for 3D-Bioprinting of Ovine Aortic Valve Interstitial Cells. *Thoracic and Cardiovascular Surgery*, *71*(S 01), e44-e45. <https://doi.org/10.1055/s-0043-1761739>
- Immohr, M. B., Dos Santos Adrego, F., Teichert, H. L., Schmidt, V., Sugimura, Y., Bauer, S., Barth, M., Lichtenberg, A., & Akhyari, P. (2022). 3D-bioprinting of aortic valve interstitial cells: impact of hydrogel and printing parameters on cell viability. *Biomed Mater*, *18*(1). <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ac9f91>
- Immohr, M. B., Teichert, H. L., Dos Santos Adrego, F., Schmidt, V., Sugimura, Y., Bauer, S. J., Barth, M., Lichtenberg, A., & Akhyari, P. (2023). Three-Dimensional Bioprinting of Ovine Aortic Valve Endothelial and Interstitial Cells for the Development of Multicellular Tissue Engineered Tissue Constructs. *Bioengineering (Basel)*, *10*(7). <https://doi.org/10.3390/bioengineering10070787>
- Jenke, A., Kistner, J., Saradar, S., Chekhoeva, A., Yazdanyar, M., Bergmann, A. K., Röttepohl, M. V., Lichtenberg, A., & Akhyari, P. (2020). Transforming growth factor- β 1 promotes fibrosis but attenuates calcification of valvular tissue applied as a three-dimensional calcific aortic valve disease model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *319*(5), H1123-h1141. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00651.2019>
- Joseph, J., Naqvi, S. Y., Giri, J., & Goldberg, S. (2017). Aortic Stenosis: Pathophysiology, Diagnosis, and Therapy. *Am J Med*, *130*(3), 253-263. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2016.10.005>
- Katsi, V., Magkas, N., Antonopoulos, A., Trantalos, G., Toutouzias, K., & Tousoulis, D. (2021). Aortic valve: anatomy and structure and the role of vasculature in the degenerative process. *Acta Cardiol*, *76*(4), 335-348. <https://doi.org/10.1080/00015385.2020.1746053>
- Kheradvar, A., Zareian, R., Kawachi, S., Goodwin, R. L., & Rugonyi, S. (2017). Animal Models for Heart Valve Research and Development. *Drug Discov Today Dis Models*, *24*, 55-62. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2018.04.001>
- Kutryb-Zajac, B., Jablonska, P., Hebanowska, A., Lango, R., Rogowski, J., Slominska, E. M., & Smolenski, R. T. (2020). Statin treatment of patients with calcific aortic valve disease modulates extracellular adenosine metabolism on the cell surface of the aortic valve. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, *39*(10-12), 1389-1399. <https://doi.org/10.1080/15257770.2020.1733603>
- Łabowska, M. B., Cierluk, K., Jankowska, A. M., Kulbacka, J., Detyna, J., & Michalak, I. (2021). A Review on the Adaption of Alginate-Gelatin Hydrogels for 3D Cultures and Bioprinting. *Materials (Basel)*, *14*(4). <https://doi.org/10.3390/ma14040858>
- Lerman, D. A., Prasad, S., & Alotti, N. (2015). Calcific Aortic Valve Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Eur Cardiol*, *10*(2), 108-112. <https://doi.org/10.15420/ecr.2015.10.2.108>
- Lindman, B. R., Clavel, M. A., Mathieu, P., Iung, B., Lancellotti, P., Otto, C. M., & Pibarot, P. (2016). Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers*, *2*, 16006. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.6>

- Lüllmann-Rauch, R., & Asan, E. (2019). *Taschenlehrbuch Histologie* (6 ed.). Georg Thieme Verlag
- Mabry, K. M., Payne, S. Z., & Anseth, K. S. (2016). Microarray analyses to quantify advantages of 2D and 3D hydrogel culture systems in maintaining the native valvular interstitial cell phenotype. *Biomaterials*, *74*, 31-41. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.09.035>
- Misfeld, M., & Sievers, H. H. (2007). Heart valve macro- and microstructure. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *362*(1484), 1421-1436. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2125>
- Naghieh, S., & Chen, X. (2021). Printability-A key issue in extrusion-based bioprinting. *J Pharm Anal*, *11*(5), 564-579. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.02.001>
- Nalluri, N., Atti, V., Munir, A. B., Karam, B., Patel, N. J., Kumar, V., Vemula, P., Edla, S., Asti, D., Paturu, A., Gayam, S., Spagnola, J., Barsoum, E., Maniatis, G. A., Tamburrino, F., Kandov, R., Lafferty, J., & Kliger, C. (2018). Valve in valve transcatheter aortic valve implantation (ViV-TAVI) versus redo-Surgical aortic valve replacement (redo-SAVR): A systematic review and meta-analysis. *J Interv Cardiol*, *31*(5), 661-671. <https://doi.org/10.1111/joic.12520>
- Nehrenheim, L., Raschke, S., Stefanski, A., Barth, M., Isabel Selig, J., Barbian, A., Fernández-Colino, A., Stühler, K., Mela, P., Albert, A., Lichtenberg, A., & Akhyari, P. (2019). Native aortic valve derived extracellular matrix hydrogel for three dimensional culture analyses with improved biomimetic properties. *Biomed Mater*, *14*(3), 035014. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab0791>
- Ning, L., Yang, B., Mohabatpour, F., Betancourt, N., Sarker, M. D., Papagerakis, P., & Chen, X. (2020). Process-induced cell damage: pneumatic versus screw-driven bioprinting. *Biofabrication*, *12*(2), 025011. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab5f53>
- Noor, N., Shapira, A., Edri, R., Gal, I., Wertheim, L., & Dvir, T. (2019). 3D Printing of Personalized Thick and Perfusable Cardiac Patches and Hearts. *Adv Sci (Weinh)*, *6*(11), 1900344. <https://doi.org/10.1002/advs.201900344>
- Oropeza, B. P., Adams, J. R., Furth, M. E., Chessa, J., & Boland, T. (2022). Bioprinting of Decellularized Porcine Cardiac Tissue for Large-Scale Aortic Models. *Front Bioeng Biotechnol*, *10*, 855186. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.855186>
- Pape, H.-C., Kurtz, A., & Silbernagl, S. (2019). *Physiologie* (9. ed.). Georg Thieme Verlag.
- Park, J., Lee, S. J., Chung, S., Lee, J. H., Kim, W. D., Lee, J. Y., & Park, S. A. (2017). Cell-laden 3D bioprinting hydrogel matrix depending on different compositions for soft tissue engineering: Characterization and evaluation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, *71*, 678-684. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.069>
- Pati, F., Jang, J., Ha, D. H., Won Kim, S., Rhie, J. W., Shim, J. H., Kim, D. H., & Cho, D. W. (2014). Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nat Commun*, *5*, 3935. <https://doi.org/10.1038/ncomms4935>
- Rajamannan, N. M., Evans, F. J., Aikawa, E., Grande-Allen, K. J., Demer, L. L., Heistad, D. D., Simmons, C. A., Masters, K. S., Mathieu, P., O'Brien, K. D., Schoen, F. J., Towler, D. A., Yoganathan, A. P., & Otto, C. M. (2011). Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation*, *124*(16), 1783-1791. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.110.006767>

- Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S. R., Anuradha, E., & Solomon, F. D. (2015). 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol*, 230(1), 16-26. <https://doi.org/10.1002/jcp.24683>
- Reina-Romo, E., Mandal, S., Amorim, P., Bloemen, V., Ferraris, E., & Geris, L. (2021). Towards the Experimentally-Informed In Silico Nozzle Design Optimization for Extrusion-Based Bioprinting of Shear-Thinning Hydrogels. *Front Bioeng Biotechnol*, 9, 701778. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.701778>
- Roth, G. A., Mensah, G. A., Johnson, C. O., Addolorato, G., Ammirati, E., Baddour, L. M., Barengo, N. C., Beaton, A. Z., Benjamin, E. J., Benziger, C. P., Bonny, A., Brauer, M., Brodmann, M., Cahill, T. J., Carapetis, J., Catapano, A. L., Chugh, S. S., Cooper, L. T., Coresh, J., Criqui, M., DeCleene, N., Eagle, K. A., Emmons-Bell, S., Feigin, V. L., Fernández-Solà, J., Fowkes, G., Gakidou, E., Grundy, S. M., He, F. J., Howard, G., Hu, F., Inker, L., Karthikeyan, G., Kassebaum, N., Koroshetz, W., Lavie, C., Lloyd-Jones, D., Lu, H. S., Mirijello, A., Temesgen, A. M., Mokdad, A., Moran, A. E., Muntner, P., Narula, J., Neal, B., Ntsekhe, M., Moraes de Oliveira, G., Otto, C., Owolabi, M., Pratt, M., Rajagopalan, S., Reitsma, M., Ribeiro, A. L. P., Rigotti, N., Rodgers, A., Sable, C., Shakil, S., Sliwa-Hahnle, K., Stark, B., Sundström, J., Timpel, P., Tleyjeh, I. M., Valgimigli, M., Vos, T., Whelton, P. K., Yacoub, M., Zuhlke, L., Murray, C., & Fuster, V. (2020). Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol*, 76(25), 2982-3021. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.010>
- Rutkovskiy, A., Malashicheva, A., Sullivan, G., Bogdanova, M., Kostareva, A., Stensløyken, K. O., Fiane, A., & Vaage, J. (2017). Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification. *J Am Heart Assoc*, 6(9). <https://doi.org/10.1161/jaha.117.006339>
- Schlamowitz, M., & Peterson, L. U. (1959). Studies on the optimum pH for the action of pepsin on "native" and denatured bovine serum albumin and bovine hemoglobin. *J Biol Chem*, 234, 3137-3145.
- Skylar-Scott, M. A., Uzel, S. G. M., Nam, L. L., Ahrens, J. H., Truby, R. L., Damaraju, S., & Lewis, J. A. (2019). Biomanufacturing of organ-specific tissues with high cellular density and embedded vascular channels. *Science Advances*, 5(9), eaaw2459. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw2459>
- Tanase, D. M., Valasciuc, E., Gosav, E. M., Floria, M., Costea, C. F., Dima, N., Tudorancea, I., Maranduca, M. A., & Serban, I. L. (2022). Contribution of Oxidative Stress (OS) in Calcific Aortic Valve Disease (CAVD): From Pathophysiology to Therapeutic Targets. *Cells*, 11(17). <https://doi.org/10.3390/cells11172663>
- Townsend, K., & Pietila, T. (2018). 3D printing and modeling of congenital heart defects: A technical review. *Birth Defects Res*, 110(13), 1091-1097. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1342>
- van der Valk, D. C., van der Ven, C. F. T., Blaser, M. C., Grolman, J. M., Wu, P. J., Fenton, O. S., Lee, L. H., Tibbitt, M. W., Andresen, J. L., Wen, J. R., Ha, A. H., Buffolo, F., van Mil, A., Bouten, C. V. C., Body, S. C., Mooney, D. J., Sluijter, J. P. G., Aikawa, M., Hjortnaes, J., Langer, R., & Aikawa, E. (2018). Engineering a 3D-Bioprinted Model of Human Heart Valve Disease Using Nanoindentation-Based Biomechanics. *Nanomaterials (Basel)*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/nano8050296>
- Vanaei, S., Parizi, M. S., Vanaei, S., Saleemizadehparizi, F., & Vanaei, H. R. (2021). An Overview on Materials and Techniques in 3D Bioprinting Toward Biomedical

- Application. *Engineered Regeneration*, 2, 1-18.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.engreg.2020.12.001>
- Weber, A., Pfaff, M., Schöttler, F., Schmidt, V., Lichtenberg, A., & Akhyari, P. (2021). Reproducible In Vitro Tissue Culture Model to Study Basic Mechanisms of Calcific Aortic Valve Disease: Comparative Analysis to Valvular Interstitial Cells. *Biomedicines*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9050474>
- Welsch, U., Deller, T., & Kummer, W. (2014). *Lehrbuch Histologie* (4. ed.). Urban & Fischer
- Wu, Z., Su, X., Xu, Y., Kong, B., Sun, W., & Mi, S. (2016). Bioprinting three-dimensional cell-laden tissue constructs with controllable degradation. *Sci Rep*, 6, 24474. <https://doi.org/10.1038/srep24474>
- Yi, B., Zeng, W., Lv, L., & Hua, P. (2021). Changing epidemiology of calcific aortic valve disease: 30-year trends of incidence, prevalence, and deaths across 204 countries and territories. *Aging (Albany NY)*, 13(9), 12710-12732. <https://doi.org/10.18632/aging.202942>
- Zhang, H., Wang, Y., Zheng, Z., Wei, X., Chen, L., Wu, Y., Huang, W., & Yang, L. (2023). Strategies for improving the 3D printability of decellularized extracellular matrix bioink. *Theranostics*, 13(8), 2562-2587. <https://doi.org/10.7150/thno.81785>
- Zhang, Y. S., Yue, K., Aleman, J., Mollazadeh-Moghaddam, K., Bakht, S. M., Yang, J., Jia, W., Dell'Erba, V., Assawes, P., Shin, S. R., Dokmeci, M. R., Oklu, R., & Khademhosseini, A. (2017). 3D Bioprinting for Tissue and Organ Fabrication. *Annals of Biomedical Engineering*, 45(1), 148-163. <https://doi.org/10.1007/s10439-016-1612-8>
- Zhao, Y., Yao, R., Ouyang, L., Ding, H., Zhang, T., Zhang, K., Cheng, S., & Sun, W. (2014). Three-dimensional printing of Hela cells for cervical tumor model in vitro. *Biofabrication*, 6(3), 035001. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/6/3/035001>

6. ANHANG

6.1 Makro Life-/Dead-Assay

```
//// this macro calculates live and dead cells
////and % of live cells from live/dead assay using
single RGB image.
//clears previous results
run("Clear Results")
if (isOpen("Results")) {
selectWindow("Results");
run("Close");
}
//open the file
run("Open...");
close("\\Others");
//set initial number of live and dead cells to 0
liveno=0;
deadno=0;
originalTitle = getTitle();
run("Split Channels");
selectWindow(originalTitle + " (blue)");
run("Close");
////red channel////
selectWindow(originalTitle + " (red)");
run("8-bit");
//put your min and max values here to adjust
brightness and contrast of the red channel
setMinAndMax(5, 150);
run("Apply LUT");
setAutoThreshold("Moments dark");
run("Convert to Mask");
run("Watershed");
selectWindow(originalTitle + " (red)");
//you can adjust size of the particles to detect in
the red channel below
run("Analyze Particles...", "size=0.0-Infinity cir-
cularity=0.00-1.00 show=Nothing include add
in_situ");
deadno=roiManager("count");
if (deadno>0) {

roiManager("Show All with labels");
roiManager("Show All");
array1 = newArray("0");
for (i=1;i<roiManager("count");i++){
array1 = Array.concat(array1,i);
}
roiManager("select", array1);
roiManager("Delete");
}
////green channel////
selectWindow(originalTitle + " (green)");
run("8-bit");
//put your min and max values here to adjust
brightness and contrast of the green channel
setMinAndMax(5, 150);
setAutoThreshold("Huang dark");
run("Convert to Mask");
run("Watershed");
selectWindow(originalTitle + " (green)");
//you can adjust size of the particles to detect in
the green channel below
run("Analyze Particles...", "size=0.0-Infinity cir-
cularity=0.00-1.00 show=Nothing include add
in_situ");
liveno=roiManager("count");
roiManager("Show All with labels");
roiManager("Show All");
array1 = newArray("0");
for (i=1;i<roiManager("count");i++){
array1 = Array.concat(array1,i);
}
roiManager("select", array1);
roiManager("Delete");
//prints results
print("live: ", liveno, "; dead: ", deadno, "; total:
", liveno+deadno, "; %live: ", liveno/(liv-
eno+deadno));
```

DANKSAGUNG

Im Laufe des Medizinstudiums stellt sich zwangsläufig die Frage, ob und wie man selbst promovieren möchte. Durch eine zufällig gestaltete Rotation der Blockpraktika am Universitätsklinikum Düsseldorf kam ich in Kontakt mit der Klinik für Herzchirurgie, die mein Leben verändern sollte. Neben den sehr interessanten Einblicken in die Herzchirurgie ergab sich die Möglichkeit einer Promotion in der neu gegründeten Forschungsgruppe für *3D Bioprinting and Cardiac Tissue Engineering* aufgrund des neu angeschafften 3D-Bioplotters. In diesem Zuge möchte ich mich besonders bei meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari für die Möglichkeit und den Support meiner experimentellen Dissertationsarbeit bedanken! Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Lichtenberg bedanke ich mich für die institutionellen Voraussetzungen für dieses einzigartige Forschungslabor! In diesem Zug sein ein großes Dankschön an die finanziellen Forschungsmittel, welche durch die Susanne-Bunnenberg-Herzstiftung gesponsert wurden, genannt. Ein besonderer Dank widme ich meinem Betreuer PD Dr. med. Moritz Immohr, der sowohl von der Konzeptualisierung, bis zur Umsetzung, der Einführung in die benötigte Methodik und Auswertung der Daten bis zur Anfertigung dieser Dissertationsschrift immens geholfen hat! Ohne dich wäre, wäre ich jetzt nicht an diesem Punkt, diese Arbeit so abgeben zu können! Ein weiterer Dank geht an meine liebe Kollegin Helena Teichert, die das Folgeprojekt zu dieser Arbeit übernommen hat. Vielen Dank für die lustigen Momente im Labor und der sich daraus resultierenden Freundschaft! Insgesamt möchte ich mich bei allen Beteiligten des Laborteams der Experimentellen Chirurgie bedanken. Es seien insbesondere Mareike, Jessica, Vera, Katharina, Robin und natürlich Gisela genannt, die mir einerseits natürlich inhaltliches Feedback gegeben als auch praktische Fertigkeiten vermittelt haben, andererseits jedoch mein Freisemester mit viel Spaß, Pancakes und den besten Lachern bei *Cards against Humanity* bereichert haben. Ich hoffe, dass ich mich mit Memes und einigermaßen gutem Kaffee aus der Senseomaschine revanchieren konnte. Weiterhin bedanke ich mich bei meiner Chefärztin und Mentorin Univ.-Prof. Dr. med. Anja M. Boos, MHBA, die mich in den letzten Zügen zur Fertigstellung motiviert hat.

Zuletzt geht der größte Dank an meine Eltern: Danke Mãe, Danke Pai, nicht nur für die finanzielle Unterstützung während des gesamten Studiums, sondern auch für die großartige Erziehung und dem jahrelangen Support, welche mich zu dem Menschen gemacht haben, der ich heute bin. Dies gilt auch für meine kleine Schwester Soraia und meinen beiden Großmüttern, die mir immer den Rücken gestärkt haben.