
**Entwicklung eines 3D-biogedruckten Blutgefäßersatzes zur Untersuchung
des zellulären Verhaltens in *In-vitro*-Gewebe-Modellen unter dynamischer
Kultivierung**

Von der Fakultät für Georessourcen und Materialtechnik der
Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen

zur Erlangung des akademischen Grades einer

Doktorin der Ingenieurwissenschaften

genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Nadja Hansen, M.Sc.

aus Hamburg

Berichtende: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Horst Fischer
Univ.-Prof. Dr. med. Stefan Jockenhövel

Tag der mündlichen Prüfung: 07.10.2025

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar

*für meine Oma Louise,
weil du mir gezeigt hast, was Liebe & Empathie bedeuten.*

Danksagung

Zu Beginn möchte ich meinem Doktorvater, Univ.-Prof. Dr.-Ing. Horst Fischer, dafür danken, dass er mir dieses Promotionsprojekt an seinem Lehrstuhl ermöglicht hat. Sein Vertrauen und seine Unterstützung haben mir die nötige Motivation und die kritische Perspektive gegeben, diese Herausforderung wissenschaftlich zu meistern. Die fachlichen Diskussionen und die durch ihn gewährte Freiheit haben mich in diesem Projekt und in meiner Persönlichkeitsentwicklung maßgeblich geprägt.

Vom Institut für Experimentelle Molekulare Bildgebung danke ich besonders Univ.-Prof. Dr. med. Fabian Kießling dafür, dass er uns oft mit seinen brillanten Ideen motiviert hat, unser Bestes zu geben. Foremost, I want to thank Fedi for the great collaboration on the tumor project. Working with you over these three years was, aside from some shared frustrations over gelatin and ECM stability issues, both fun and truly inspiring. Thank you for sharing your knowledge and helping me through this time. I know we both agree that we owe a lot to Rasika and Alessandro, who were always ready to lend us a hand and made the experimental phase much easier and smoother. Thanks to you both as well.

Ich möchte mich herzlich bei Univ.-Prof. Dr. med. Stefan Jockenhövel bedanken, der sich die Zeit genommen hat, meine Arbeit zu lesen und meine Verteidigung zu begleiten. Durch seine aufschlussreichen und anregenden Fragen wurde die Diskussion besonders lehrreich und inspirierend.

Ebenfalls danke ich dem gesamten ZWBF-Team. Besonders möchte ich Roswitha Davtalab danken, die durch ihre Vorbereitung jeden Zellversuch möglich gemacht hat. Danke für dein offenes Ohr – sowohl beruflich als auch privat. Auch danke ich Michael Weber für seine Unterstützung jeglicher technischer Art.

A huge thank you also goes to Sanja, for always guiding me on how to solve my problems, consistently helping out, and explaining everything so clearly. You are a great teacher, and I learned so much from you.

Of course, I have to thank my favorite student of all time, Natalija, who accompanied me throughout my entire PhD journey. You were always there to lend a hand whenever I needed it, and I am incredibly proud of all your achievements. You made my life as your supervisor so much easier because of your intelligence and the many good ideas you brought to the table. Thanks for joining me in this chapter of my journey.

Die herausfordernde Zeit wurde durch Kollegen wie Johannes Hahn und Ramin Nasehi zu einer großartigen Erfahrung und zu etwas Besonderem gemacht. Johannes, ich danke dir dafür, dass du mich immer unterstützt hast, egal mit welchem Problem ich zu dir gekommen bin. Du hattest stets ein offenes Ohr, ob es um berufliche Herausforderungen und Ideen oder um persönliche Belange ging. Unsere Diskussionen und deine Perspektiven haben mir oft weitergeholfen. Danke auch, dass du immer den Taxifahrer auswählst und sicherstellst, dass man gut nach Hause kommt. Ramin, you truly became one of my best friends during this time. Although I wasn't your biggest fan at first (only for a super short time, of course ;)), you quickly became one of my favorite colleagues because of your open-mindedness, intelligence, and hilarious way of viewing and discussing everything. I couldn't have made it through this time-or afterward-without you. I'm so grateful our friendship is still going strong and that I can always count on you. And, though you might not want to hear it, you always behaved really responsibly

toward me. Thanks for always giving me your honest opinion—even when that meant telling me I’m just a weird person!

Ein besonderer Dank geht an meine Familie. Danke, dass ihr mir diesen Weg ermöglicht und mich motiviert habt. Ich bin stolz, Teil dieser Familie zu sein.

Außerdem danke ich meinem ehemaligen Chef Leon Olde-Damink, der damals an mich geglaubt und mich auf die Idee gebracht hat, eine Promotion zu beginnen. Leon, du hast mich mehr geprägt, als du vermutlich ahnst. Durch dich habe ich Selbstbewusstsein erlangt, den Mut erlangt, für mich und andere einzustehen, und gelernt, offen zu kommunizieren. Danke dafür.

A big thanks also goes to my new colleagues at ReGEN, who motivated me, pushed me through those final steps, and celebrated even the smallest accomplishments with me. I’m so happy to work with you all. A special thanks to Resy!

Am meisten danke ich meinen Freunden Manu, Sonya, Viola und Steffi. Ich danke euch für die unzähligen Weinabende, bei denen wir alles offen besprechen konnten. Ohne euch hätte ich mich an dieses Projekt niemals gewagt. Danke, dass ihr immer an mich glaubt, mir Zuspruch gebt und stets für mich da seid. Ich liebe euch.

Manu, dir danke ich ganz besonders, da du der Mensch bist, zu dem ich am meisten aufsehe. Ich liebe dich bedingungslos, und daran ändert weder die Distanz noch der Ozean zwischen uns etwas. Danke, dass ich mich bei dir immer ausheulen konnte, und danke, dass du eine Inspiration für mich bist. Danke für deine Freundschaft, deine Liebe und dafür, dass du so bist, wie du bist.

And finally, I want to thank my partner, Rob, from the bottom of my heart — for giving me the final push when I needed it most, for your quiet strength, and for being my safe harbor in turbulent times, where I can find calm and focus on what truly matters. Thank you for your love, your passion, and for being such an incredible person.

Kurzzusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein 3D-biogedrucktes *In-vitro*-Modell eines Blutgefäßes erstellt, das neue Erkenntnisse über die Mechanismen der Gewebeangiogenese liefern soll und mit dem neue Medikamentenwirkstoffe getestet werden können. Dafür wurde ein Bioreaktor aus PEEK entwickelt, der direkte Bildgebung und Perfusion ermöglicht. Des Weiteren wurden unterschiedliche Hydrogele auf Kollagen- und Fibrin-Basis auf verschiedene Zellarten abgestimmt, miteinander verglichen und die Zell-EZM Interaktion analysiert. Es zeigte sich, dass reines 2,5 %-iges Fibrin geeignet ist, um eine stabile Endothelschicht als Auskleidung der 3D-gedruckten Makro-Gefäße zu erhalten. Großporigere und weniger steife Kollagen-Fibrin-Kompositionen eigneten sich im Gegensatz dazu vor allem für Gewebemodelle der Leber und als Matrizes von Tumorsphäroiden. Hepatozyten zeigten eine gesteigerte metabolische Aktivität durch eine erhöhte Produktion von Albumin in einem Hydrogel, das hinsichtlich der Steifigkeit der gesunden Leber (4,5 kPa) entsprach. Es zeigte sich ferner, dass das Einbringen von Fibroblasten und HUVECs in die Matrix positiven Einfluss auf die Zelladhäsion sowie den Zellmetabolismus hatten. HUVECs in der umliegenden Matrix begünstigten die Ausbildung von Mikrogefäßen aus den gedruckten Makrogefäßen heraus. Es war vorteilhaft, wenn die verdruckten HUVECs zunächst drei Stunden in der Gelatine kultiviert wurden um stabil an der umliegenden Matrix anzuhafte, bevor das Gel ausgespült wurde. Die Endothelschicht war deutlich stabiler, wenn diese 72 Stunden Zeit hatte, sich unter statischen Bedingungen auszubilden, bevor die Durchströmung und damit die dynamische Kultivierung startete. Mittels Doppel-Opfermaterial-Methode konnten verzweigte Gefäßstrukturen bis zu einem Durchmesser von 10 µm hergestellt werden. Das entwickelte *In-vitro*-Modell könnte in Kombination mit dem weiter zu entwickelnden Leber- und dem Tumormodell neue Erkenntnisse zur metastatischen Kaskade und in der Folge für neue Ansätze zur Krebstherapie liefern.

Abstract

The present work describes the development of a novel 3D-bioprinted *in vitro* model of a blood vessel to provide new insights into the mechanisms of tissue angiogenesis and to test new drug substances. A bioreactor made of PEEK was developed, which enables direct imaging and perfusion. Furthermore, different collagen- and fibrin-based hydrogels were tailored to the different cell types, compared with each other and the cell-ECM interactions were studied. The results show the benefit of pure 2.5 % fibrin for obtaining a stable endothelial layer as a lining for the 3D-bioprinted macrovessels. In contrast, collagen-fibrin compositions with larger pores and less stiffness were particularly suitable for tissue models of the liver and as matrices of tumor spheroids. In particular, hepatocytes showed an increased metabolic activity by an increased production of albumin in the hydrogel that corresponded to the stiffness of the healthy liver (4.5 kPa). It was also shown, that the introduction of fibroblast and HUVECs into the matrix had a positive influence on cell adhesion and metabolism. HUVECs in the surrounding matrix increased the formation of microvessels from the printed macrovessel. It was advantageous if the printed HUVECs were first cultured in the gelatine for three hours to adhere to the surrounding matrix, before the gel was rinsed out. The endothelial layer was significantly more stable if it had 72 hours to form under static conditions before the flow through and thus the dynamic cultivation started. Using the double sacrificial material method, branched vascular structures up to a diameter of 10 µm could be produced. The combination of the developed *in vitro* model with a further developed liver and the tumor model could provide new insights into the metastatic cascade and subsequently for new approaches for cancer therapy.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgender Originalarbeit vorab publiziert:

De Lorenzi F, Hansen N, Theek B, Daware R, Motta A, Breuel S, Nasehi R, Baumeister J, Schöneberg J, Stojanovic N, von Stillfried S, Vogt M, Müller-Newen G, Maurer J, Sofias AM, Lammers T*, Fischer H*, Kiessling F* (2024). Engineering mesoscopic 3D tumor models with a self-organizing vascularized matrix. *Adv Mater* 36:e2303196. [25]

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung.....	1
2	Stand der Erkenntnisse	3
2.1	Tissue Engineering und <i>In-vitro</i> -Modelle	3
2.2	Blutgefäße.....	4
2.2.1	Aufbau und zelluläre Zusammensetzung	4
2.2.2	Angiogenese	5
2.2.3	<i>In-vitro</i> -Gefäßmodelle	6
2.3	Leber.....	6
2.3.1	Funktionen der Leber.....	6
2.3.2	Aufbau der Leber.....	7
2.3.3	Wichtige Zellarten der Leber.....	7
2.3.4	<i>In-vitro</i> -Lebermodelle	8
2.3.5	Marker für Leberzellen.....	9
2.4	<i>In-vitro</i> -Tumormodelle.....	9
2.5	Hydrogele	11
2.5.1	Kollagen	11
2.5.2	Gelatine.....	12
2.5.3	Fibrinogen / Fibrin.....	12
2.5.4	Pluronic F127	13
2.6	Mikroextrusionsbasiertes 3D-Biodrucken.....	13
3	Material und Methoden	15
3.1	Bioreaktor und Blutgefäßdesign.....	15
3.1.1	Allgemeiner Aufbau und Materialien.....	15
3.1.2	Design.....	16
3.1.3	Abdichtung	17
3.1.4	Kanaldesign und Analyse	18
3.2	Materialsynthese.....	19
3.2.1	Gelatine.....	19
3.2.2	Kollagen und Fibrinogen sowie Kombinationen aus beiden.....	20
3.2.3	Pluronic.....	21
3.2.4	Polydimethylsiloxan (PDMS)	21
3.3	Hydrogel-Charakterisierung	21
3.3.1	Kompressionsversuch.....	21
3.3.2	Wasserverlust-Analyse	23
3.3.3	Kontaktwinkelmessung	23
3.3.4	Rasterelektronenmikroskopische Analyse (REM)	23

3.4	Zellbiologische Experimente	23
3.4.1	Zellkultur.....	24
3.4.2	Tumorsphäroide	25
3.4.3	Lebend/Tot-Färbung	26
3.4.4	Metabolische Aktivität.....	26
3.4.5	Immunofluoreszenzfärbung und Mikroskopie.....	27
3.5	Endothelialisierung	28
3.5.1	Statische Endothelialisierung.....	28
3.5.2	Dynamische Endothelialisierung	29
3.6	Der 3D-Biodruck-Prozess	30
3.6.1	Beschichtung der Deckgläser.....	30
3.6.2	Herstellung der Biotinte	30
3.6.3	Einfluss der Kühlung auf die Endothelzellen	30
3.6.4	Vorbereitung des 3D-Biodruckers und der Bioreaktoren	31
3.6.5	Bestimmung der Anhaftungszeit.....	31
3.6.6	3D-Biodruck der Gefäßstrukturen	31
3.7	Gewebemodelle.....	32
3.7.1	Vaskularisierung	32
3.7.2	Lebermodell	33
3.7.3	Tumormodell.....	34
3.8	Herstellung von Mikrokanälen.....	36
3.8.1	PDMS-Stempel-Methode.....	36
3.8.2	Doppel-Opfermaterial-Methode.....	38
4	Ergebnisse.....	41
4.1	Hydrogel Eigenschaften.....	41
4.1.1	Kompressionsverhalten	41
4.1.2	Wasserverlust.....	42
4.1.3	Kontaktwinkel.....	42
4.1.4	Morphologie und Porengrößen	45
4.2	Endothelbildung.....	47
4.2.1	Endothelbildung unter statischer Kultivierung	47
4.2.2	Endothelbildung unter dynamischer Kultivierung.....	52
4.3	Biogedruckte Konstrukte	56
4.3.1	Einfluss der Kühlung auf die Viabilität der Endothelzellen	56
4.3.2	Bestimmung der Anhaftungszeit.....	57
4.3.3	Einfluss Fibroblasten.....	59
4.4	Vaskularisierung	61
4.4.1	Kanaldesign.....	61

4.4.2	Statische Untersuchungen.....	62
4.5	Lebermodell.....	63
4.5.1	Zweidimensionale Versuche	63
4.5.2	Dreidimensionale Versuche.....	64
4.5.3	Dynamische Kultivierung.....	70
4.6	Tumormodell	72
4.7	Herstellung von Mikrokanälen	74
4.7.1	Erstellung von Mikrokanälen mittels PDMS-Stempel-Methode.....	74
4.7.2	Erstellung von Mikrokanälen mittels Doppel-Opfermaterial-Methode	76
5	Diskussion	79
6	Zusammenfassung.....	90
7	Literaturverzeichnis.....	92
8	Anhang	99

1 Einleitung und Zielsetzung

Ein wichtiger Aspekt der Grundlagenforschung sowie der Medikamententestung sind sogenannte *In-vitro*-Modelle. Damit können (patho-) physiologische Prozesse im Labor simuliert werden. Der Weg eines Medikaments beginnt in der Grundlagenforschung. Bereits hier können *In-vitro*-Modelle dazu beitragen, neue Erkenntnisse und Ansätze für neue Medikamente zu finden. Durch das Verständnis des Ablaufes eines Prozesses (z. B. Tumorwachstum) können neue Ansatzpunkte für Medikamente entwickelt werden. Die Entwicklung eines Medikaments verläuft über mehrere Stufen. Die entwickelten *In-vitro*-Modelle helfen, im weiteren Verlauf auch durch einen hohen, schnellen und reproduzierbaren Durchsatz, eine erste Einschätzung der Wirksamkeit eines Medikaments zu erhalten, bevor diese in die präklinische Phase und somit in den Tierversuch aufgenommen werden. Die zur Zeit verwendeten *In-vitro*-Modelle bestehen zum größten Teil aus zweidimensionalen oder sehr einfach strukturierten dreidimensionalen (z. B. Zell-Sphäroiden) Zellversuchen, welche dazu beitragen die Verträglichkeit und die Wirksamkeit eines neuen Wirkstoffes zu untersuchen. Die besten Kandidaten aus diesen Versuchen gehen im Anschluss in ein Tiermodell. Hierbei werden dann die Verträglichkeit und die Wirksamkeit in einem kompletten multizellulären Organismus untersucht. Besteht ein Medikament diese Versuche, werden sie in einer ersten klinischen Studie im Menschen eingesetzt. Diese besteht zunächst aus drei Phasen und ist mit einem hohen Zeit- und Geldaufwand verbunden. Problematisch an diesem System ist, dass Medikamente, die gegebenenfalls zunächst vielversprechend im Tiermodell waren, im menschlichen Organismus entweder keine oder sogar negative Reaktionen zeigen können. Bei der Verwendung von aussagekräftigeren *In-vitro*-Modellen unter Verwendung humaner Zellen könnte der Prozess der Medikamententestung verbessert und beschleunigt werden, was ebenfalls zu einer Kosten-, aber vor allem auch Reduktion von Tierversuchen führen könnte.

Bei fortschrittlichen *In-vitro*-Modellen werden mehrere Zellen, die sich z. B. innerhalb eines Organs finden, zusammen kultiviert. Diese können dann in einem weiteren Schritt nicht nur als Zellschicht oder in einem Sphäroid verwendet, sondern in ein Hydrogel eingebracht werden, das die extrazelluläre Matrix nachbildet. Die räumliche Anordnung der Zellen sollte dabei ebenfalls näher der Anatomie des entsprechenden Gewebes entsprechen. Hierbei helfen heutige Technologien wie der 3D-Biodruck. Wichtig ist auch das Einbringen von tubulär angeordneten Endothelzellen, die die natürlichen Blutgefäße nachbilden. Durch das Einbringen von artifiziellen und durchströmbaren Gefäßen können auch größere Gewebestrukturen über längere Zeiträume kultiviert werden. Dadurch wird mehr Raum für Komplexität geschaffen, während ebenfalls die natürliche Barriere der Endothelzellen an der Innenwand der Gefäße nachempfunden wird und eine weitere wichtige Komponente mit einbringt. Diese spielt vor allem bei der Medikamententestung eine wichtige Rolle, wenn es um die Aufnahme, Dosierung und Wirksamkeit geht. Um noch einen Schritt weiter zu gehen, können *In-vitro*-Modelle durch die dynamische Kultivierung mechanischen Beanspruchungen ausgeliefert werden. Die Zellen erfahren durch die Perfusion mit Medium Scherspannungen, die für die Ausrichtung der Endothelzellen entlang der Gefäßwand und ihre dadurch geschaffene Barrierefunktion von Wichtigkeit sind. Des Weiteren können Druckgradienten oder Nährstoffgradienten analog der Situation *in vivo* nachgestellt werden. Diese können, zusammen mit den mechanischen Stimuli, dazu führen, dass sich neue Mikrogefäße ausbilden. Im Zusammenhang mit dem 3D-Biodruck, können sich somit Mikrogefäße von vorgedruckten Makrogefäße ausbilden um z. B. pathologische Gewebemodelle, wie Tumorsphäroide zu versorgen. Dies dient wiederum der Grundlagenforschung wie z. B. der metastatischen Kaskade.

Ziel dieser Arbeit war, die oben genannten Anpassungen an die Komplexität von *In-vitro*-Modellen in einem Bioreaktor, der an eine Pumpe und somit an einen Perfusionskreislauf angeschlossen werden kann, durchzuführen. Zudem sollte das Modell auch Bildgebung während der Kultivierung erlauben, ohne dabei die Proben zu zerstören oder das Experiment stoppen zu müssen. Der Fokus lag dabei auf der Ausbildung stabiler und organisierter Blutgefäße, die mittels 3D-Biodruck in den Bioreaktor eingebracht werden. Wichtig war in dieser Arbeit, dass die Endothelzellen auch bei langzeitiger dynamischer Kultivierung eine stabile und vollständige Endothelschicht, die die Gefäßwand auskleidet, ausbildeten. Als Beispiel für die Zellmodelle sollten diese dann zum einen mit einem Leber-Modell und zum anderen mit einem Tumor-Modell kombiniert werden. Dabei sollten passende Hydrogele gefunden werden sowie die passende Zellzusammensetzung für das jeweilige Einzel-Modell. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten in Anlehnung an die sogenannten 3R-Regeln (Refinement, Reduction, Replacement) dazu beitragen, dass Tierversuche zukünftig ersetzt oder zumindest reduziert werden können.

2 Stand der Erkenntnisse

2.1 Tissue Engineering und *In-vitro*-Modelle

Der Begriff Tissue Engineering beschreibt die Generierung von neuem Gewebe durch die Verwendung ingenieurwissenschaftlicher Methoden unter Berücksichtigung der biologischen Anwendung und Applikation [109]. Dieses interdisziplinäre Feld wird genutzt, um biologischen Ersatz für die Wiederherstellung, Erhaltung oder Verbesserung der Gewebefunktion zu schaffen [48]. Die Nachbildung eines Gewebes im Labor kann zum einen dazu dienen, physiologische Abläufe besser zu verstehen, aber auch um pathologische Prozesse studieren zu können. Dies ist zum Teil im Tier schwieriger, da dort vor allem „Endpunkte“ eines Prozesses (z. B. der metastatische Tumor als solches) abgebildet werden, ohne die einzelnen Schritte zuvor (Ausschüttung von Faktoren oder die pathologische Veränderung von Zellen) wirklich studieren zu können [60]. Zum anderen können die *in vitro* gezüchteten Gewebe oder die Replikation von spezifischen Funktionen zum Beispiel für das Screening neuer Medikamente verwendet werden. Aufgrund zum Teil unzureichender Vorhersagen über die Verträglichkeit und die Wirksamkeit eines Medikaments durch Tierversuche ist der Bedarf an *In-vitro*-Modellen gestiegen, um *in vivo* Szenarien des menschlichen Organismus‘ besser nachzubilden zu können [13]. Dabei ermöglichen Fortschritte in der Biomaterialforschung bessere Zell-Zell, sowie Zell-Matrix-Interaktionen. Fabrikationstechniken wie dem 3D-Biodruck und Fortschritte in der Mikrofluidik ermöglichen es, komplexere Strukturen zu erschaffen und diese sogar physiologischen Stimuli auszuliefern, während eine verbesserte Versorgung von Nährstoffen gewährleistet wird [13] [117] [39]. *In-vitro*-Modelle liefern dabei eine systematische und standardisierte Analyse von unterschiedlichen (patho-) physiologischen Abläufen in einer kontrollierten Umgebung, um die Anzahl an Tierversuchen zu verringern oder in Zukunft sogar zum Teil vollständig zu ersetzen [89]. Typische *In-vitro*-Modelle sind sogenannte *Organ-on-a-chip* Systeme. Dabei werden PDMS oder andere Polymere mit Kanälen versehen und durch spezifische Zellanordnungen (Beschichtung von semi-permeablen Polymermembranen mit Endothelzellen oder das Einbringen von Zell-Sphäroiden) werden die benötigten Funktionen nachgebildet. Diese Art von Modellen bietet den Vorteil, dass geringe Zellmengen bereits ausreichen, um komplexere Strukturen und Funktionen nachzubilden. Diese Chips können perfundiert und mikroskopiert werden, da sie nur eine geringe Größe aufweisen, wenn die verwendeten Materialien optische ausreichende Eigenschaften aufweisen. Dadurch ist es möglich, mehrere Zeitpunkte eines Experiments während der Langzeitkultivierung mit dem Mikroskop aufzunehmen um z. B. die biologische Veränderung innerhalb eines Zeitraumes zu analysieren [13]. Ebenfalls ist es möglich unterschiedliche Organ-Modelle miteinander zu verbinden, um so einen Großteil des Organismus‘ noch besser nachzubilden. Bei der Verwendung von mehreren Organ-spezifischen Modellen, spricht man auch vom „human-on-the-chip“ [1]. Vor allem das Einbringen von physiologisch relevanten Blutgefäßmodellen bringt eine entscheidende Rolle in der Vergleichbarkeit von *in vitro* und *in vivo* Situation mit sich [68] und wird im nächsten Kapitel näher erläutert.

2.2 Blutgefäße

Die allgemeine Funktion von Blutgefäßen besteht im Transport insbesondere von Blutzellen, Nährstoffen, Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid, Wasser und Abfallprodukten. Ein funktionelles und stabiles Geflecht ist notwendig, um Gewebe im gesamten Körper am Leben zu erhalten [119].

Die Bildung von Blutgefäßen ist bis heute noch nicht vollständig erforscht. Man weiß bis dato jedoch schon einige Faktoren und Prozesse die bei der Aussprossung von Gefäßstrukturen eine wichtige Rolle spielen. Zunächst wird zwischen der Vaskularisierung und der Angiogenese unterschieden. Die Vaskularisation beschreibt das Entstehen von neuen Blutgefäßen, ohne vorher existierender Gefäße, *de novo*, welche in der embryonalen Entwicklung stattfindet. Demgegenüber bezieht sich die Angiogenese auf das Verzweigen bzw. der Aussprossung von bereits existierenden Gefäßen. Verbinden sich dabei zwei oder mehrere Gefäße, spricht man von der Anastomose [40]

2.2.1 Aufbau und zelluläre Zusammensetzung

Die generelle Architektur von Blutgefäßen hängt von ihrem Durchmesser ab und davon, ob es sich um Arterien oder Venen handelt und lässt sich wie in Abbildung 1 gezeigt in unterschiedliche Kategorien unterteilen. Vor allem in den großen Gefäßen ist der generelle Aufbau von Intima, Media und Adventitia klar definiert. Große elastische Arterien (z. B. die Aorta) verästeln sich zu mittelgroßen Gefäßen. Diese besitzen einen Durchmesser von einigen 100 µm bis zu Millimetern und bestehen aus einer einzelnen Endothelschicht (Intima), die die Innenwand auskleidet, und einer umgebenden Schicht aus Glattmuskelzellen (Media). Diese wiederum werden von Fibroblasten in extrazellulärer Matrix umgeben (Adventitia). Mit abnehmenden Durchmesser, 20–200 µm, spricht man von kleinen Arterien und Arteriolen, die ebenfalls aus einer einzelnen Schicht Endothelzellen bestehen, welche von Glattmuskelzellen umgeben sind. Kapillaren hingegen, bestehen lediglich aus einer einzelnen Zellschicht von Endothelzellen, die von Perizyten gestützt werden [66,99]. Aufgrund dieser Struktur ist ein schneller Austausch von diffusionsfähigen Substanzen zwischen Blut und umgebendem Gewebe möglich.

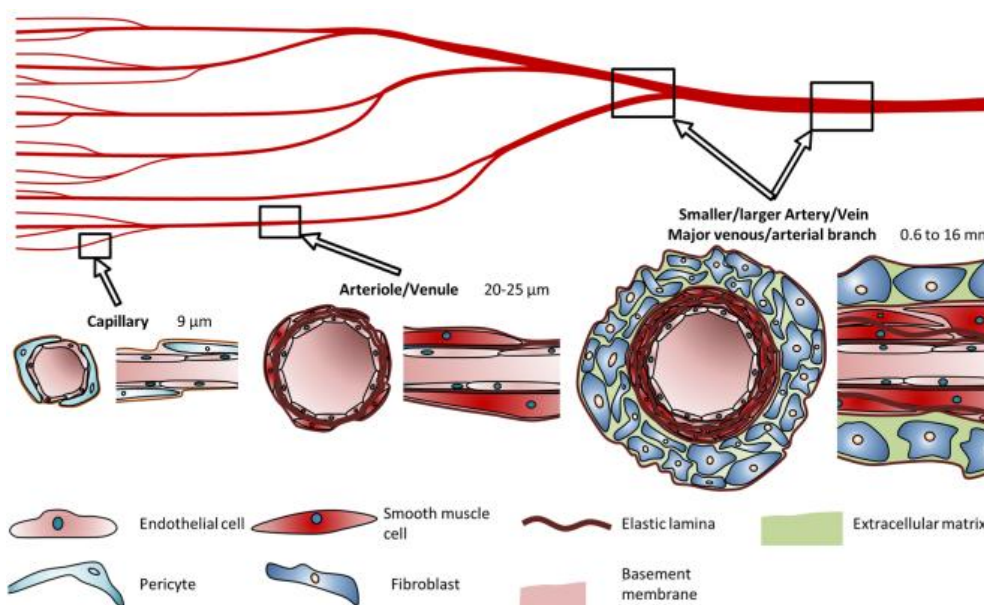


Abbildung 1: Grafische Darstellung der Unterteilung der unterschiedlichen Gefäßarten nach ihren Durchmessern sowie deren zellulären Aufbau [99].

2.2.2 Angiogenese

Angiogenese beschreibt den Prozess der Ausbildung von Blutgefäßen, zunächst Kapillaren, aus bereits existierenden Gefäßen (siehe Abbildung 2) [40]. Damit es zur Entstehung neuer Gefäße kommt, muss ein Bedarf, z. B. durch Hypoxie (Sauerstoffmangel), bestehen. Dieser Bedarf kann zum Beispiel von Tumorzellen hervorgerufen werden, um den Tumor besser mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen, damit dieser wachsen kann. Zunächst kleiden Endothelzellen die Innenwand der Gefäße Kopfsteinpflaster-ähnlich aus. Durch pro-angiogene Faktoren, wie z. B. Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA), werden die Endothelzellen aktiviert, wodurch sich ihre Zell-Zell Kontakte auflösen und die umgebende Basalmembran degradiert wird [40] [83]. Nur einzelne Endothelzellen, die durch den Stimulus aktiviert werden, werden zu sogenannten „Tip-Zellen“ und leiten den Prozess des Aussprossens. Um die Umgebung zu erkunden, bilden diese viele dynamische Filopodialerweiterungen aus. Die Endothelzellen, die der Tip-Zelle folgen, werden als „Stiel-Zellen“ bezeichnet und spielen eine unterstützende Rolle bei der Ausbildung neuer Kapillaren, während sie die Verbindung zum Hauptgefäß aufrecht erhalten. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Lumen der neuen Gefäße. Die Ausbildung verläuft gerichtet, bis zwei Tip-Zellen von unterschiedlichen Hauptgefäßen aufeinander treffen und sich durch starke Zell-Zell-Verbindungen miteinander verbinden (Anastomose). Ebenfalls spielt das Rekrutieren von anderen Zellen durch Faktoren wie Transforming Growth-Factor β 1 (TGF β 1) eine wichtige Rolle [83]. Dabei werden Zellen wie z. B. Periozyten oder Glattmuskelzellen rekrutiert um bei der Fusion für die Stabilisierung zu sorgen. Im Anschluss wird das Lumen ausgebildet, damit Blut durch die neue Verbindung strömen kann. Dazu polarisieren die Endothelzellen und Verbindungsproteine, wie z. B. Vascular Endothelial Cadherin (VE-Cadherin), werden seitlich umverteilt und es kommt zur Ausbildung eines Lumens. Für die kontrollierte Angiogenese, die durch Strömungen angeregt wird, ist der Faktor VEGF essentiell. Diese wird durch mechanische Stimuli der extrazellulären Umgebung initiiert [40].

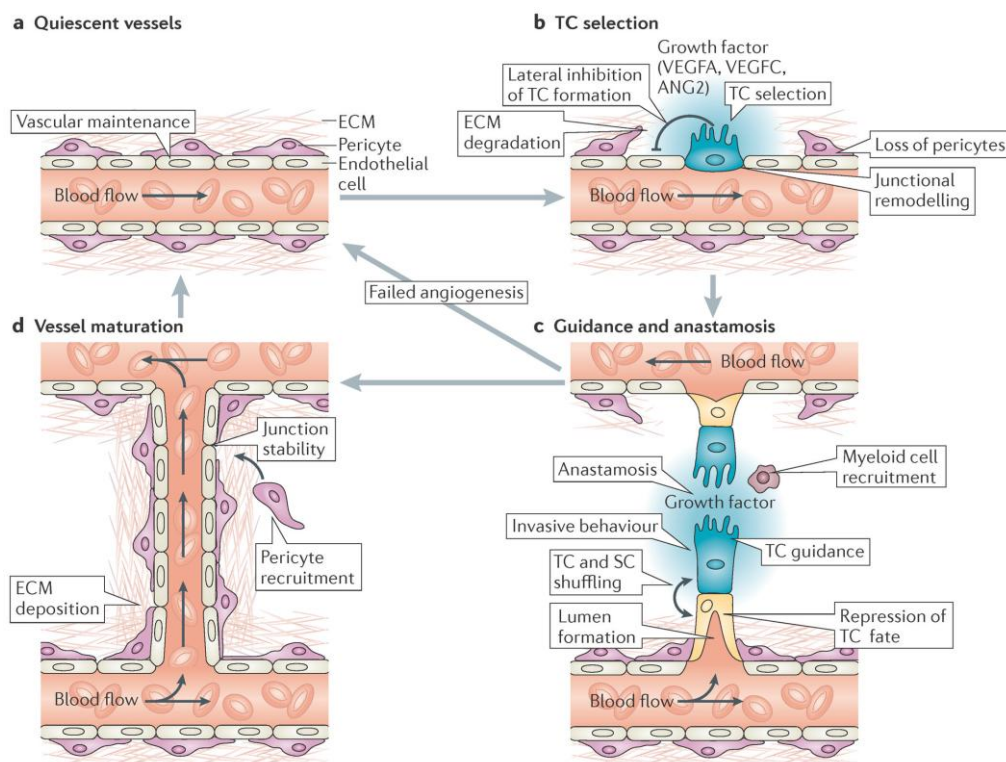


Abbildung 2: Grafische Darstellung der zellulären Mechanismen der Aussprossung von neuen Blutgefäßen, der Angiogenese [40].

2.2.3 *In-vitro*-Gefäßmodelle

Vaskularisation ist ein kritischer Aspekt der Gewebszüchtung. Gefäßstrukturen, die mit Medium durchspült werden können, sorgen dafür, dass Zellen auch außerhalb der Diffusionsgrenze von circa 200 µm mit ausreichenden Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden und somit am Leben bleiben [7]. Dabei ist vor allem Sauerstoff der limitierende Faktor, da dieser nur langsam diffundiert, der Verbrauch durch Zellen jedoch hoch ist [73]. *In-vitro*-Gefäßmodelle bilden häufig zunächst die größeren Blutgefäße nach, während die kleineren Kapillaren dazu gebracht werden (durch z. B. mechanische und zelluläre Zusammensetzung und/oder das Einbringen von gewissen Wachstumsfaktoren) sich selbst zu abspreizenden Kapillaren zu organisieren [119]. So zeigten Sobrino et al., dass Endothelzellen, die in einer Matrix zwischen zwei perfundierten Kanälen eingeschlossen sind, durch die Perfusion ein Geflecht aus Mikrokanälen ausbilden, die ebenfalls durchströmbar waren [101]. Mori et al., entwickelten ein durchströmbares Lebermodell, indem sie die Hohlstruktur durch eine Nadel im Bioreaktor einbrachten, welche von Hydrogel umgeben wurde. Nach dem Gelieren des Hydrogels, wurde die Nadel vorsichtig entfernt und es konnte in die zurückbleibende Hohlstruktur Endothelzellen eingespült werden, welche im Anschluss die Innenwand auskleideten [68]. Ein weiterer Ansatz um Hohlstrukturen zu erschaffen und dabei die umgebende Matrix *in vivo* ähnlicher zu halten, ist das Verwenden von Opfermaterialien, wie Gelatine, die mittels 3D-Biodruck in komplexe Formen gedruckt werden können. Entweder enthält die Gelatine bereits Endothelzellen, oder diese werden nach dem Auslösen der Gelatine eingespült. Die Hohlstruktur wird dabei von Hydrogelen, wie z. B. Kollagen, Fibrin oder Hydrogel-Mischungen, umgeben, an denen die Endothelzellen anhaften können [99] [12]. Diese Struktur kann auch durch das koaxiale Verdrücken der beiden Schichten erreicht werden [58]. So druckten Maji et al., eine Hydrogel-Kombination aus Kollagen und Alginate mittels einer Koaxialen Nadel, an die zwei Spritzen angeschlossen waren. Die umgebende Schicht bestand dabei aus dem Kollagen-Alginate-Hydrogel in das HepG2-Zellen gemischt wurden. Der Kern bestand dabei aus einem Gelatine-HUVECs Gemisch. Das Konstrukt wurde mittels CaCl₂ Vernetzt und die Gelatine, nach dem Anhaften der Endothelzellen ausgespült [58].

2.3 Leber

Die Leber ist mit rund 2,5 % des gesamten Körpergewichtes eines Erwachsenen das größte und schwerste innere Organ des menschlichen Körpers [76]. Ihre Funktionen (Kapitel 2.3.1), Aufbau und anatomische Verbindung (Kapitel 2.3.2) machen die Leber zu einem lebenswichtigen Organ. Aufgrund ihrer Lage im Körper, und dadurch das sie das am stärksten durchblutete Organ in unserem Körper ist, macht es sie aber auch zum Hauptort für die Ausbildung von metastatischen Tumoren [15]. Jedoch besitzt sie auch die besondere Fähigkeit, sich innerhalb kürzester Zeit selbst zu regenerieren [34] [2].

2.3.1 Funktionen der Leber

Die Hauptfunktion der Leber besteht im Metabolismus von Nährstoffen und körperfremden Substanzen sowie der Ausscheidung von Abfallprodukten [76]. Nährstoffe werden in der Leber vor allem in den Hepatozyten gespeichert und nach Bedarf über den Blutstrom in den Kreislauf eingebracht, um dadurch den gesamten Körper mit ausreichend Nährstoffen zu versorgen. Nährstoffe erhält die Leber über das Blut des Magendarmtraktes. Das Blut wird in der Leber gefiltert, Nährstoffe gespeichert und Abfallprodukte über die Galle oder wasserlösliche Abbauprodukte über die Niere als Urin ausgeschieden [76] [59] [17]. Die erzeugte Galle ist ebenfalls notwendig, um Fette verdauen zu können [17]. Des Weiteren werden in der Leber Medikamente verstoffwechselt. Das Häm-Protein Cytochrome P450, und dessen Subfamilien

sind vor allem in der Leber, genauer im endoplasmatischen Retikulum der Leberzellen, vorhanden und agieren wie Enzyme [86]. Die Enzyme oxidieren Verbindungen von Medikamenten, wodurch diese vom Körper aufgenommen und verwertet werden können. Ebenfalls schützt dieser Prozess vor der Anhäufung von schädlichen fettlöslichen Verbindungen, da diese wasserlöslich sind und dadurch ausgeschieden werden können [86] [51]. Die Funktion der Leber, zu recyceln und zu speichern, führt jedoch auch dazu, dass das Risiko an Gewebeschäden hoch ist [84].

2.3.2 Aufbau der Leber

Die Leber befindet sich zwischen dem venösem Blutkreislauf aus dem Magen-Darm-Trakt und der Milz und dem Herzen [84]. Sie teilt sich in zwei (Haupt-) Leberlappen auf, dem rechten und dem linken. Versorgt wird die Leber über die Leberarterie (sauerstoffreiches Blut) und die Pfortader (Vene mit nährstoff- aber auch giftstoffreichem Blut u.a. aus dem Magen-Darm-Trakt), welche in der Leberpforte eintreten. Diese verzweigen sich zu einem feinem Netzwerk an Kapillaren, sodass alle Substanzen die Leberzellen erreichen. Die gebildete Gallenflüssigkeit wird wiederum über ein feines Netzwerk an Kapillaren über den Gallengang in die Gallenblase (als Zwischenspeicher) und anschließend in den Zwölffingerdarm ausgeschieden [76].

Die Leberlappen setzen sich aus kleinen sechseckigen Funktionseinheiten, den Leberläppchen, zusammen und bestehen aus einer Zentralvene, die zur Vena interlobularis und dann zur Lebervene führt. Ebenfalls enthalten ist die Pfortader, Pfortaderarteriolen, sowie Gallengängen in allen sechs Ecken. Hauptsächlich bestehen die Leberläppchen aus einer leichten Matrix aus Kollagen, die die Zellen zusammen hält [76]. Die Pfortader und die Pfortaderarteriolen sind über ein feines Mikrogefäßsystem, den sogenannten Sinusoids, mit der Vena interlobularis verbunden [2].

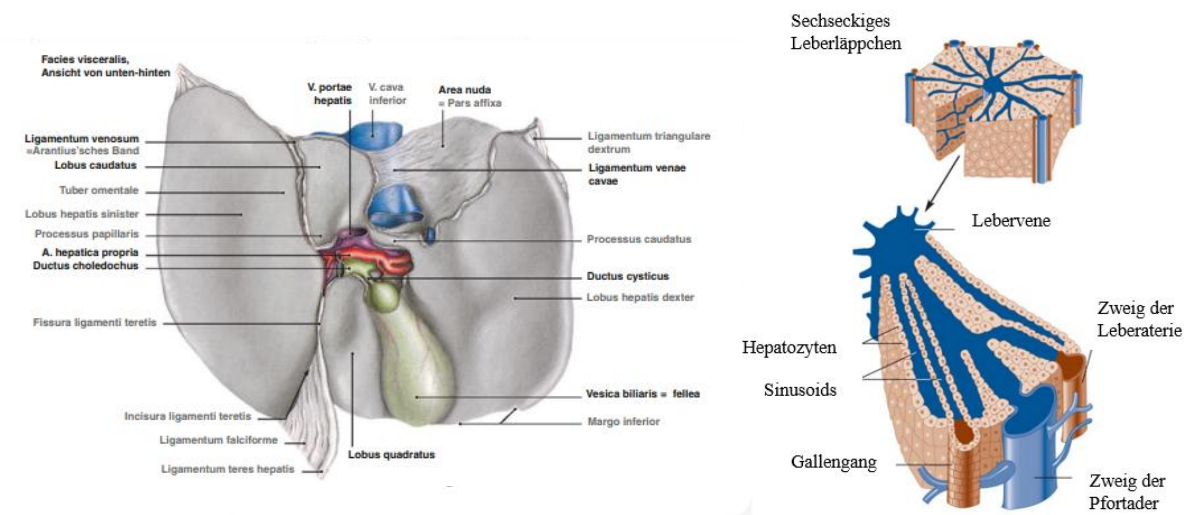


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Leberaufbaus. Teilweise übernommen aus [62] und adaptiert aus [24]

2.3.3 Wichtige Zellarten der Leber

An den Funktionen der Leber sind sowohl parenchymale als auch nicht-parenchymale Leberzellen beteiligt. Während die Hepatozyten 60 % der gesamten Leberzellanzahl und 80 % der gesamten Leberzellmasse ausmachen, bestehen die restlichen 40 % aus nicht-

parenchymalen Zellen, welche nur 6-7 % des gesamten Lebervolumens ausmachen. Hepatozyten sind komplexe, stark differenzierte Zellen epithelen Ursprungs. Sie sind polarisiert, um bestimmte Stoffe aufnehmen, transportieren oder ausscheiden zu können [6]. Den größten Beitrag der Synthese- und Stoffwechsellleistung der Leber erbringen die Hepatozyten. Dazu extrahieren sie Toxine und Nährstoffe aus dem Blut. Hauptaufgabe der Hepatozyten ist ihre Beteiligung am Lipid-, Kohlenhydrat-, sowie Eiweißstoffwechsel und die Produktion von Serumproteinen, wie z. B. Albumin. Des Weiteren produzieren sie die lebenswichtige Galle. Ebenfalls findet die Metabolisierung von Xenobiotika, wie z. B. Medikamenten, innerhalb der Hepatozyten statt [76].

Zu den nicht-parenchymalen Zellen gehören die Lebersternzellen (Myofibroblasten-ähnliche Zellen), Kupfferzellen (resistente Leber-Makrophagen) und die Lebersinusoide (spezielle Leberendothelzellen). Hepatozyten sind untereinander so verbunden, dass sie plattenförmige Strukturen ausbilden, wobei sich Sinusoide für den Durchfluss von Blut ausbilden. Die Sinusoidwand ist dabei von den Lebersinusoiden ausgekleidet, wobei ebenfalls Kupfferzellen dort anzufinden sind. Zwischen den Hepatozyten und den Sinusoiden, befindet sich der Disse-Raum, in dem sich die Lebersternzellen befinden (siehe Abbildung 4). [81] [2]

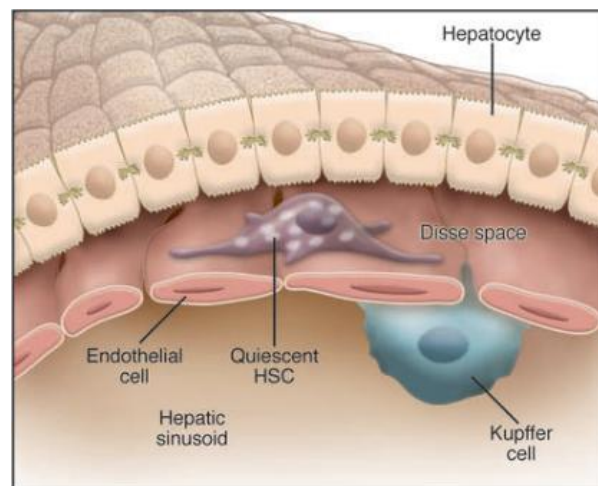


Abbildung 4: Struktureller Aufbau der Sinusoide, sowie die Lage der unterschiedlichen Zellarten innerhalb der Struktur [45].

2.3.4 *In-vitro*-Lebermodelle

Das wichtigste Modell zur Untersuchung von Medikamenten, ist das Lebermodell. Die Leber spielt eine wichtige Rolle bei der Untersuchung der Effektivität eines Medikaments, sowie der Entgiftung des Blutes [13]. Derzeitige *In-vitro*-Lebermodelle bestehen hauptsächlich aus isolierten primären Hepatozyten und werden unter anderem als *Screening*-Systeme von Xenobiotika, Toxizität und Wirksamkeit genutzt. Isolierte primäre Hepatozyten verlieren schnell leberspezifische Funktionen, wenn sie unter Standard zwei-dimensionalen (2D) *In-vitro*-Zellkulturbedingungen gehalten werden, wodurch ihre Verwendung in komplexeren oder länger andauernden Anwendung erschwert wird [13] [6].

Ein weiterer Ansatz ist die Verwendung von Biopsie-Gewebe oder präzise geschnittenen Leberscheiben. So verwendeten Palma et al. präzise geschnittene Scheiben humaner Leber, um z. B. ein Modell einer alkohol-geschädigten Leber nachzustellen [78]. Diese ähneln der komplexen Architektur des Organs, wobei alle vorkommenden Zelltypen in ihrer natürlichen Gewebe-Matrix-Anordnung vorhanden sind. Jedoch ist aufgrund der erschwerten Beschaffung die Eignung für einen schnellen und hohen Durchsatz nicht gegeben. Des Weiteren verlieren sie schnell ihre Funktionalität, wenn sie *in vitro* kultiviert werden [117] [65]. Um die komplexe

Struktur des Organs und vor allem das komplexe Gefäßsystem zu erhalten, gibt es ebenfalls den Ansatz der Dezellularisierung von Teilen oder ganzen Tierlebern, die dann im Anschluss mit humanen Zellen rezellularisiert werden können. Baptista et al. dezellularisierten die Lebern unterschiedlicher Spezien, um das Baugerüste und vor allem die Gefäßstruktur der natürlichen Leber aufrecht zu erhalten und diese als Matrix für Lebermodelle zu nutzen. Dazu rezellularisierten sie diese mit Leber und Endothelzellen. Dieses Modell konnten Sie für sieben Tage an einer peristaltischen Pumpe angeschlossen, mit einem Durchfluss von 0,5 mL/min dynamisch kultivieren [10]. Dieses Modell kann zum einen für die Medikamententestung, aber vor allem könnte es in der Zukunft für die Organtransplantation genutzt werden [10] [52]. Die Erschaffung eines solchen rezellularisiertem Organs ist mit viel Zeit und Aufwand verbunden und es werden eine große Anzahl an Zellen benötigt, wodurch der Aufwand für eine volle Organtransplantation zu rechtfertigen ist, jedoch weniger für die Verwendung als Medikamententestung. Einfache Modelle können dabei zum Beispiel aus Lebersphäroiden bestehen, die in einen Chip eingebracht und dort dynamische kultiviert werden können. Ebenfalls können Leberzellen oder Lebersphäroiden zuvor in einem geeignetem Hydrogelen eingebettet werden, um die natürliche Umgebung der Zellen nachzuempfinden. Die Ko-Kultivierung von mehreren Zelltypen verbessert dabei ebenfalls die Funktionalität der Modelle [98]. Diese Methodik kann von einfachen Modellen starten, wobei Hepatozyten als Mikrogewebe über mehrere Tage statisch kultiviert werden [56] oder komplexeren Umfang erreichen, indem diese in einen Bioreaktor eingebracht werden und dabei dynamisch kultiviert werden [108]. Gerade die Verwendung von physiologisch-dynamischen Ansätzen spielt in der Analyse von Medikamenten eine wichtige Rolle. Da diese die wichtigen physiologischen Signale für den Transport von Gasen und metabolischen Substanzen mit sich bringen [13]. Die Verwendung von 3D-Biodrucktechniken kann dabei helfen, automatisierte, präzise kontrollierte Modelle mit hohem Durchsatz zu fertigen. Dabei können unterschiedliche Zelltypen oder multizelluläre Lebersphäroide in Hydrogele durch den 3D-Biodruck in einen Bioreaktor eingebracht werden und dieser dynamisch über einen langen Zeitraum kultiviert werden. Durch passende optische Eigenschaften des Bioreaktors, können mehrere Zeitpunkte unter dem Mikroskop aufgenommen werden. Das durchspülende Medium kann gesammelt und auf bestimmte Biomarker analysiert werden. Am Ende des Versuches, kann das Lebergewebe fixiert und auf geeignete Proteine mit der autofluoreszierenden Mikroskopie analysiert werden [13] [6] [68].

2.3.5 Marker für Leberzellen

Um zu untersuchen, ob das Modell der Leber funktional bleibt, wird zunächst die allgemeine Morphologie und Selbstorganisation der einzelnen Zelltypen betrachtet. Hepatozyten gruppieren sich zu größeren Strukturen zusammen, da Zell-Zell-Kontakte sehr wichtig für ihre Funktionalitäten sind. Ebenfalls wird die Produktion von Albumin durch die Hepatozyten gemessen [52]. Primäre Hepatozyten verlieren in der 2D-Kultur ihre Polarisation, eine geringere Ausschüttung von Albumin und eine verringerte Enzymaktivität von Zytochrome P450 ist zu messen [6]. Des Weiteren wird das Protein MRP 2 eingefärbt und fluoreszierend mikroskopiert, um die typische Ausbildung von Gallenkanälchen (bile canaliculi) zu veranschaulichen [6,13] [68] [98].

2.4 *In-vitro*-Tumormodelle

Zur Entstehung eines Tumors kommt es durch Mutationen in den Genen einer Zelle. Drei Gruppen spielen dabei die entscheidenden Rollen: Onkogene, die für das Zellwachstum verantwortlich sind, Tumorsuppressor-Gene und Reparaturgene [50]. Entsteht ein Ungleichgewicht zwischen Zellwachstum und dessen Suppression, können Zellen

unkontrolliert wachsen. Während gutartige Tumore nicht über ihre Ortsgrenze hinauswachsen, überwinden bösartige Tumore die Grenzen von Gewebeschichten. Die Entstehung von metastatischen Tumoren beginnt damit, dass angiogene Signale ausgeschüttet werden, wodurch Blutgefäße dazu angeregt werden, in den Tumor hineinzuwachsen. Dies hilft dem Tumor dabei mit ausreichend Nährstoffen und Sauerstoff versorgt zu werden und weiter zu wachsen. Als nächstes lösen sich Zellen aus dem primären Tumor und degradieren dazu umgebende extrazelluläre Matrix ab. Im Anschluss intravasieren sie in ein Blutgefäß und zirkulieren im Blutkreislauf. Hat eine Tumorzelle ihr Zielorgan erreicht, muss diese dort am Endothelium adhären, aus dem Blutgefäß extravasieren und in das Organ migrieren. Die metastatische Zelle wird dort proliferieren und einen sekundären Tumor (Metastase) ausbilden [93] [60] [94]. Es ist bekannt, dass bösartige Tumore organspezifische Metastasen ausbilden [11]. So streut der Dickdarmtumor häufig in die Leber oder Lunge, dafür kaum in die Nieren [88]. Eine Erklärung dafür bietet die „seed and soil“ (Samen und Boden) Theorie von Stephen Paget's (1855-1926). Dabei beschreibt der Samen die Tumorzellen mit metastatischer Aktivität, die eine besondere Affinität für bestimmte Organe (dem Boden) aufweisen. Es kommt nach dieser Theorie nur zur Entwicklung einer Metastase, wenn Samen und Boden, also Tumorzelle und die Umgebung im Zielorgan zusammen passen [77]. Demnach spielen nicht nur die Mechanik und Strömungsmuster eine wichtige Rolle, sondern die Mikroumgebung ist ebenfalls entscheidend für die Ausbildung eines sekundären Tumors und erklärt, warum z. B. die Lunge, Leber und Knochenmark so anfällig sind [94].

Zur Verbesserung der Translation von Tumormedikamenten in die klinische Anwendung, sollte nicht nur der Tumor allein, sondern in seiner Mikroumgebung betrachtet und in *In-vitro*-Modellen nachgebildet werden. Diese können durch den 3D-Biodruck präzise platzierte lebende Zellen mit funktionalen Biomaterialien, Gefäß-ähnlichen Strukturen und dynamische Kultivierung zur Ausbildung von Gradienten an Wachstumsfaktoren und mechanischen Faktoren, beinhalten. Vaskularisierte Tumormodelle helfen dabei, das allgemeine Verständnis von Tumorwachstum und deren Ausbreitung besser zu verstehen und präklinische Aussagen über Tumormedikamente zu erhalten [64]. Präklinische Studien konzentrieren sich vor allem auf die Behandlung von Tumoren, während 90 % der krebisbedingten Todesfälle auf Metastasen zurückzuführen sind [60] [88]. Neue Erkenntnisse zeigen, dass auch mechanische Signale durch die Mikroumgebung eine entscheidende Rolle in der metastatischen Kaskade spielen [60]. So bringt die Wahl der Zellkomposition, das gewählte Hydrogel und auch das Design der eingebrachten Blutgefäße, sowie der Strömungsverlauf entscheidende Aspekte ein. Um jeden Schritt der metastatischen Kaskade analysieren zu können, sollte neben einem primären Tumor auch der Einfluss der umgebenden extrazellulären Matrix (EZM), sowie das Zusammenspiel von z. B. Stromazellen (Fibroblasten) und Endothelzellen im Modell abgebildet werden. Dies wird erreicht, indem in die umgebende Matrix Fibroblasten und Endothelzellen eingebracht werden. Ebenfalls wird durch von Endothelzellen ausgekleidete Hohlstrukturen für die Perfusion von Medium die native Situation, der Intra- und Extravasion der Tumorzelle, besser simuliert. Das Einbinden von unterschiedlichen Organmodellen die alle untereinander durch einen einzigen mikrofluidischen Kreislauf miteinander verbunden sind, vervollständigt die metastatische Kaskade [93] [64]. Neben dem Erlangen von neuen Kenntnissen über Tumore im Allgemeinen oder ihrer Metastasierung, liegt ein Fokus der Forschung in der Entwicklung von personalisierter Medizin. *In-vitro*-Tumormodelle können dabei helfen, individuelle Therapien, wie z. B. T-Zellen oder natürliche Killerzellen Immuntherapien, patientenspezifisch auszutesten, indem Biopsien vom Patienten entnommen werden und in das *In-vitro*-Modell eingebracht werden [16].

2.5 Hydrogele

Hydrogele sind hydrophile, drei-dimensionale (3D) Netzwerke aus Polymerketten, die aufgrund von funktionalen Gruppen in der Lage sind, eine große Menge an Wasser zu binden, ohne sich darin aufzulösen [61][116] [112]. Das gebundene Wasser erlaubt die Diffusion von löslichen Molekülen, während die Polymer-Matrix die Struktur aufrechterhält [112]. Die Polymerketten vernetzen sich dabei entweder durch physikalische oder durch chemische Faktoren, wie zum Beispiel Temperatur, pH oder Ionenkonzentration. Hydrogele besitzen Eigenschaften von flüssigen, aber auch festen Materialien, dabei weist der Elastizitätsmodul ein ausgeprägtes Plateau auf und einen kleineren Viskositätsmodul. Diese mechanischen Eigenschaften weisen somit Relaxationsverhalten auf [112]. Dabei werden sie in natürliche Hydrogele, wie Kollagen, Fibrinogen und Hyaluron und in synthetisch hergestellte Hydrogele, wie Methylmethacrylat oder Pluronic, unterteilt [117] [116] [73] [4]. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur nativen Extrazellulären Matrix und ihrer Fähigkeit eine hohe Kapazität an Wasser zu speichern und permeabel zu sein, werden sie im Bereich des Tissue Engineering verwendet [95]. Die Eigenschaften von Hydrogelen können in einem gewissen Grad auf die Bedürfnisse, z. B. durch den Einsatz von unterschiedlichen Konzentrationen oder Vernetzern, eingestellt werden. Dabei entsprechen die Bedürfnisse dem jeweiligen System das nachgebildet werden soll und somit z. B. der Steifigkeit, der Porengröße oder dem Degradationsverhalten [39] [4]. Für den 3D-Biodruck ist es von Vorteil, ein scherverdünnendes Hydrogel zu verwenden, um die Zellen auch bei schmalen Düsen schonend verdrucken zu können. Zudem sollte das Hydrogel in kürzester Zeit nach Austritt aus dem Druckkopf gelierbar sein und seine gelierte Form behalten [4]. Die poröse Matrix dient dabei als Stützgerüst für die Proliferation, Adhäsion und Migration von Zellen, wobei sie in richtiger Verwendung auch die richtigen physiologischen und mechanosensitiven Stimuli liefert [73] [97]. Je nach Wahl des Hydrogels, können und sollen Zellen die Matrix abbauen und ihre eigene Matrix exprimieren, wodurch die Umgebung der Zellen und die Ausreifung des Konstrukts mit der *In-vivo*-Situation vergleichbar wird [117].

2.5.1 Kollagen

30 % der Gesamtmasse an Proteinen im menschlichem Körper bestehen aus Kollagen [90]. Kollagen ist der Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix. Die Primärstruktur besteht aus langen Proteinketten, die eine linksgängige Helix ausbilden (Sekundärstruktur). Charakteristisch für Kollagen ist, dass jede dritte Aminosäure der Proteinkette Glycin ist, sowie die häufige Wiederholung der Sequenz Glycin-Prolin-Hydroxyprolin [18]. Drei dieser Helices bündeln sich zu einer rechtsgängigen Triplehelix (Tertiärstruktur, Tropokollagen), die durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird. Durch diese gegenläufige Verdrillung, erlangt Kollagen seine charakteristische Zugfestigkeit. Mehrere Tripelhelices verbinden sich zu Kollagenfibrillen (Quartärstruktur, 100–500 nm dick) und diese wiederum zu Kollagenfasern. Dabei bündeln sich Kollagenfibrillen versetzt, welches unter dem Elektronenmikroskop ein typisches Bandmuster ausbildet [14,63]. Die Biosynthese von Kollagen findet neben den Chondro- und Osteoblasten unter anderem auch hauptsächlich in Fibroblasten statt [8]. Bis heute bekannt sind 28 unterschiedliche Kollagentypen (Typ I bis XXVIII), die sich durch ihre Struktur und Charakteristika unterscheiden [90]. Vor allem Kollagen Typ I wird als Hydrogel für das Tissue Engineering verwendet, da es mit 90 % die relevanteste Form in der natürlichen EZM ist und dadurch von den Zellen gut angenommen oder sogar für die Biosynthese verwendet werden kann. Die Degradierung von Kollagen geschieht dabei enzymatisch [97]. Primäre Hepatozyten behalten ihren Phänotyp, wenn sie auf Kollagen-I beschichteten Zellkulturflaschen kultiviert werden, während sie unter anderem ihre Polarisation verlieren und eine geringere Albumin Produktion in herkömmlicher 2D-Kultur ohne die Kombination von

Kollagen aufweisen [6]. Ebenfalls spielt Kollagen eine Rolle in der Metastasierung von Tumoren, da Krebsgewebe zwischen 0,9–4,5 % Kollagen enthält, während gesundes Gewebe deutlich weniger enthält [85]. Kollagen ist einfach und günstig zu extrahieren. Typische Quellen sind Rattenschwänze und die Haut von Schweinen und Rindern [4]. Aufgrund der schwachen mechanischen Eigenschaften von Kollagen-Hydrogelen vor allem über längeren Zeitraum in Bezug auf Kompression oder Stabilität, da es leicht degradiert werden kann, wird es häufig mit Vernetzern oder in Kombination mit mechanisch stärkeren Hydrogelen verwendet. Ebenfalls ist ein weiterer Nachteil, dass Kollagen als Hydrogel bei der Gelierung eine starke Kontraktionseigenschaft aufweist und dadurch der Wasserverlust relativ hoch ist [97].

2.5.2 Gelatine

Wird Kollagen denaturiert oder hydrolysiert, entsteht Gelatine. Es ist ein thermoreversibles Hydrogel, das durch Änderung der Temperatur die Gel-Sol-Phasen wechseln kann [100]. Gelatine quillt in Wasser und verflüssigt sich je nach Art bereits bei Raumtemperatur. Kühlt es z. B. bei 4 °C ab, formt es, je nach Konzentration, ein stabiles Gel aus. Dabei ist die Gelierung stark von Faktoren wie der Temperatur und dem pH-Wert abhängig [110]. Es bildet dabei unspezifische Vernetzungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische und hydrophobe Bindungen aus. Diese Bindungen sind leicht durch Erwärmen zu brechen, und die Gelatine verflüssigt sich erneut bei Temperaturen über 30 °C [110] [100]. Während Gelatine in der Medizin z. B. für pharmazeutische Kapseln zur Umhüllung von Wirkstoffen verwendet wird, sind die reversiblen Eigenschaften vor allem im 3D-Biodruck von großem Vorteil. So wird Gelatine als Platzhalter 3D-gedruckt und von anderen Hydrogelen, wie z. B. Kollagen oder Fibrin umschlossen. Die Gelatine und das umgebende Hydrogel kann dabei bereits Zellen enthalten. Während das umschließende Hydrogel geliert, kann die Gelatine bei Körpertemperatur (37 °C) im Inkubator verflüssigt und anschließend ausgespült werden [36]. Zurück bleiben Hohlstrukturen die als Blutgefäßersatz in *In-vitro*-Modellen genutzt werden können [36] [99] [106] [110].

2.5.3 Fibrinogen / Fibrin

Fibrinogen, sowie zugehörige Gerinnungsfaktoren werden unter anderem von Hepatozyten produziert, die sie an das Blut weitergeben. Kultiviert man Hepatozyten über einen längeren Zeitraum, kann man in ihrer Umgebung Fibrin-Fasern finden [6] [95]. Fibrinogen geliert durch den Gerinnungsfaktor Thrombin zu Fibrin. Im Körper trägt es zur Wundheilung bei, und es ist Bestandteil der extrazellulären Matrix in vielen Organen. Es enthält wie Kollagen Fasern, die als Zellgerüst dienen und die Proliferation von Zellen unterstützen, weshalb es vielfach als Hydrogel im Tissue Engineering verwendet wird [95]. Im Körper befindet sich Fibrinogen im Blutplasma und kann aus diesem extrahiert und für die Forschung verwendet werden [42]. Es geliert in Kontakt mit Thrombin innerhalb kürzester Zeit, wobei die Eigenschaften des Fibrin-Hydrogels durch Variation der Konzentration, der Temperatur und des pH-Wertes beeinflusst werden können [95]. Fibrin zeigt sehr gute Adhäsionseigenschaften zu Zellen. In Verbindung mit Endothelzellen verbessert Fibrin die Angiogenese [104]. Jedoch degradiert Fibrin schnell. *In vivo* geschieht dies durch Plasminogen, das von Endothelzellen ausgeschüttet wird. Um den Degradationsprozess zu verlangsamen, kann das Plasmin Serin Protease Enzym durch die Zugabe von Transexamsäure blockiert werden [95]. Ebenfalls kann durch die Zugabe von Aprotinin die Aktivität des Enzyms Matrix Metalloproteinase (MMP), welches für den Umbau der Matrix verantwortlich ist, reduziert werden [3]. Um die mechanische Stabilitäten von Fibrinogen zu erhöhen, kann die Konzentration angehoben werden. Ein weiterer Ansatz ist die Zugabe von Kalziumchlorid (CaCl₂), welches die Fibrinogenfasern vernetzt und die

Polymerisation von Fibrinogen zu Fibrin beschleunigt [82]. Fibrin allein oder in Kombination mit anderen Hydrogelen (z. B. Kollagen) wird häufig verwendet, um Gewebe- oder Angiogenese-Modelle zu erforschen [111] [99]. Fibrin ist von Natur aus angiogenetisch und fördert neben der Ausschüttung von vaskulären Faktoren (insbesondere VEGF) die Produktion von EZM-Proteinen, welche für eine stabile Ausbildung von Blutgefäßen wichtig sind [69] [23].

2.5.4 Pluronic F127

Pluronic F127 (Pluronic) ist auch bekannt unter dem Namen Poloxamer 407 und beschreibt ein synthetisches, ungiftiges und nichtionisches Kopolymer, das zum einen aus Polyethylen- und Polypropylen-Oxide aufgebaut ist und eine amphiphile Natur besitzt [27]. Aufgrund der Eigenschaft, gleichzeitig hydrophil, als auch lipophil zu sein, wird es unter anderem als Oberflächenbeschichtung von mikrofluidischen Chips verwendet und um Medikamente oder Zellen verkapselt zu transportieren [27]. Eine weitere Besonderheit dieses Kopolymers ist die reversible, thermale Polymerisation. Während es sich bei Raumtemperatur im Gel-Zustand befindet, geht es in den Sol-Zustand über, sobald die Temperaturen sich verringern.[71] [35]. Pluronic eignet sich ebenfalls für den Biodruck mit Zellen, da Studien gezeigt haben, dass in Pluronic eingeschlossene Zellen durch den Extrusionsdruck weiterhin eine Viabilität von über 80 % besaßen [35]. Diese Zellen können jedoch in reinem Pluronic nicht kultiviert werden, da es sich in Zellkulturmedium nach kurzer Zeit auflöst [35]. Ein weiterer Nachteil von Pluronic ist, dass es die Proliferation und Selbstorganisation von eingeschlossenen Zellen nicht fördert, da es biologisch inert ist [41] [71] [38].

2.6 Mikroextrusionsbasiertes 3D-Biodrucken

Der 3D-Druck von biologischen Materialien wie Hydrogelen oder Zellen wird *Bioprinting* oder Biodruck genannt. Im Vergleich zum Pipettieren oder Gießen der Biomaterialien, zum Beispiel zur Erzeugung von Gewebemodellen, bringen die Biodruck-Verfahren Präzision im Aufbau von Strukturen mit sich, die dem natürlichen dreidimensionalen Aufbau besser entsprechen. Des Weiteren können durch den 3D-Biodruck komplexe Strukturen mit unterschiedlichen Materialien, Zellkompositionen und/oder bioaktiven Stoffen realisiert werden [72]. Der 3D-Biodruck hat in den letzten Jahren das *Tissue Engineering* auf eine neue Entwicklungsstufe gehoben, wodurch immer komplexere und vielfältigere Modelle realisiert wurden [103]. So wurden zum Beispiel komplexe vaskuläre Strukturen in dreidimensionale Gewebemodelle mit unterschiedlichen Zelltypen eingebracht, um die Perfusion und somit das Überleben der Modelle zu verbessern [9]. Maßgebliche Komponente dieser Technik ist das Trägermaterial der eingebetteten Zellen, auch Biotinte genannt, das in der Regel aus den oben bereits beschriebenen Hydrogele besteht. Neben der Zytokompatibilität werden weitere mechanische Ansprüche an das Material gestellt, um es für den Druck mit Zellen verwenden zu können. Die mechanischen Anforderungen an die Biotinte können je nach Druckverfahren variieren [71] [113] [118]. Es gibt unterschiedliche Techniken für den 3D-Biodruck, die je nach Anwendung, Anforderung und Auflösung ihre Vor- und Nachteile mit sich bringen [113]. Die beiden etablierten Techniken sind das tropfenbasierte Inkjet-Bioprinting das zum Beispiel durch magnetisch gesteuerte Ventile einzelne Tropfen an Biotinte positioniert und das Mikroextrusions-Druckverfahren, das im nächsten Unterkapitel näher beschrieben wird [113] [57], da es für die Experimente der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.

Das Mikroextrusions-Druckverfahren beschreibt das Verdrucken von Material, das entweder durch eine mechanische oder pneumatische Kraft durch eine Nadel auf einer Plattform abgelegt wird. Dabei werden ununterbrochene Stränge, üblich mit zylindrischem Querschnitt, Lage für

Lage dreidimensional aufgebaut. Beim Mikroextrusions-Druckverfahren entspricht der innere Durchmesser der Nadel dabei wenige bis einige hundert Mikrometer (μm) [57]. Diese Technik erlaubt es, innerhalb kurzer Zeit größere Gewebemodelle im Bereich von mehreren Zentimetern mit unterschiedlichen Materialien und Zellkonzentrationen sowie das direkte Verdrucken von Zellsphäroiden, herzustellen [32]. Gelierungs- und Druck-Parameter, abhängig vom zum verdruckendem Material, können durch das Erwärmen oder Kühlen des Druckkopfes oder der Plattform oder durch das Einbringen von UV-Licht direkt am Austritt des Hydrogels zur schnellen Vernetzung, angepasst werden. Des weiteren kann durch Druckgeschwindigkeit, Durchmesser der Nadel und pneumatischen Druck auf die Kartusche (oder Spritze), in dem sich die Biotinte sich befindet, der gedruckte Strang und somit das Gerüst angepasst werden. Um die Zellen beim Druck so wenig wie möglich zu schädigen, sollten vor allem scherverdünnende Hydrogele verwendet werden, da innerhalb der Nadel des Druckkopfes Scherspannungen auf die Zellen wirken, die diesen schaden können. Dafür muss je nach Material auch der Durchmesser und der Druck eingestellt werden, um eine höchstmögliche Viabilität nach dem Druck der Zellen zu gewährleisten. Dadurch wiederum kann es aber zu Einschränkungen hinsichtlich der Druckauflösung kommen [118].

3 Material und Methoden

3.1 Bioreaktor und Blutgefäßdesign

Für die dynamische Kultivierung wurden für die benötigten Anforderungen eigens konstruierte Bioreaktoren angefertigt. Dabei beschreibt Kapitel 3.1.1 den allgemeinen Aufbau, sowie die verwendeten Materialien und Kapitel 3.1.2 das genaue Design der Bioreaktoren. Kapitel 3.1.3 geht speziell auf die Abdichtung der Reaktoren ein, da diese ein hohes Risiko für die dynamische Kultivierung darstellten. Die unterschiedlichen Designs der zu verdruckenden Kanäle werden in Kapitel 3.1.4 beschrieben.

3.1.1 Allgemeiner Aufbau und Materialien

Die Bioreaktoren wurden mit der Software *Autodesk Inventor* modelliert. Wie in Abbildung 5A dargestellt, besteht der Bioreaktor aus einem Hauptkörper, einem Deckel und einem Boden, welche mit M3 Schrauben verschlossen wurden.

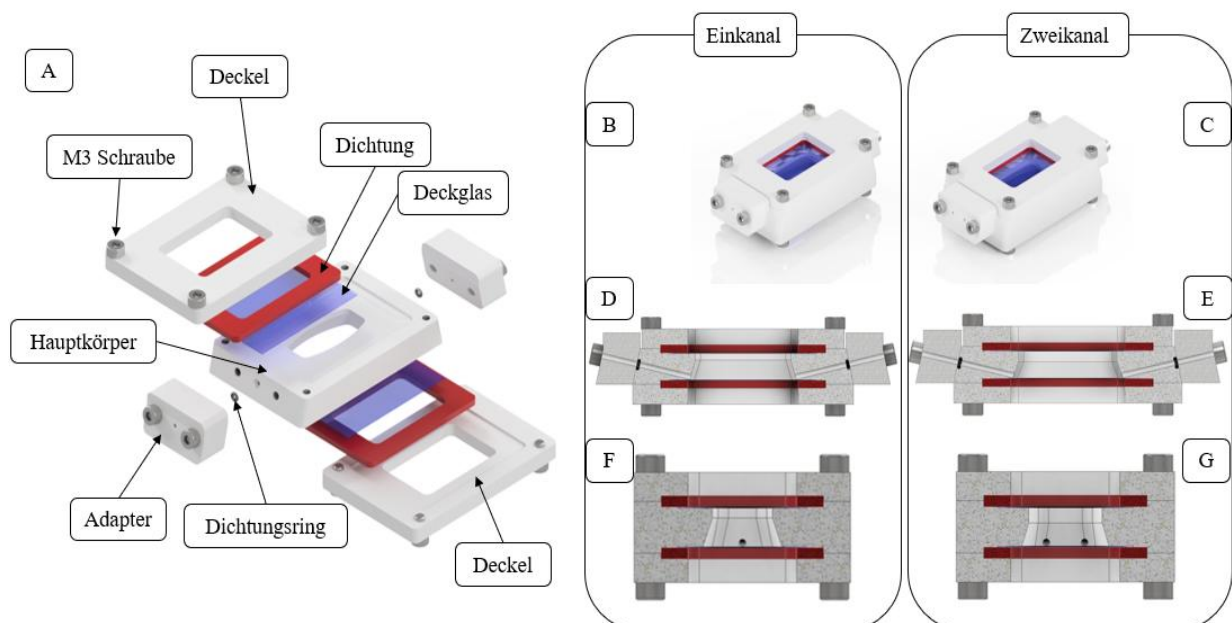


Abbildung 5: Aufbau der Bioreaktoren. A zeigt die einzelnen Komponenten, die für beide Arten gleich sind, bis auf die Anzahl der Kanäle, wie in B–C zu sehen. D–E zeigen den Querschnitt entlang der langen Kante. F–G zeigen den Querschnitt der kurzen Kante. Für die Darstellung wurde die Software Autodesk Inventor verwendet.

Zwischen Deckel / Boden und Hauptkörper befanden sich Deckgläser, welche mit Silikondichtungen versiegelt wurden. Des Weiteren bestand der Bioreaktor aus Adaptern für die Nadeln, welche ebenfalls mit M3 Schrauben angebracht wurden, wobei die Nadeln durch Dichtungsringe (O-Ringe) abgedichtet wurden. Der Hauptkörper des Bioreaktors sowie der Boden, der Deckel und die Adapter für die Nadeln wurden aus Polyetheretherketon (PEEK) gefertigt und durch CNC-Fräsen (Computerized Numerical Control) in der wissenschaftlichen Werkstatt der Uniklinik RWTH Aachen hergestellt. PEEK eignet sich besonders aufgrund der hohen chemischen sowie der Temperaturbeständigkeit und ist dabei bioinert. Um das Mikroskopieren des Innenraums auch während des Experiments zu ermöglichen, ohne dabei den Reaktor zu öffnen, wurden Fenster in den Boden und den Deckel eingebracht. Für diese

Mikroskopiefenster wurden herkömmliche unbehandelte Mikroskopie-Deckgläser aus Borosilikatglas (Brand, Wertheim) mit den Abmessungen 24 x 40 mm und einer Dicke zwischen 0,13 und 0,17 mm verwendet. Diese eignen sich aufgrund ihrer guten optischen Eigenschaften und der geringen Dicke. Die Mikroskopiefenster auf beiden Seiten des Bioreaktors ermöglichten Ereignisse, wie den vorzeitigen Abbau des Hydrogels oder Strömungsfehler zu erkennen. Des Weiteren eigneten sich die Bioreaktoren dadurch auch für die beidseitige Benutzung, wie in Kapitel 3.5.2 gezeigt wird. Dazu konnte der Reaktor entweder dazu verwendet werden, indem die Ein- und Auslässe auf den Boden zeigten, um diese durch 3D biogedruckte Gefäße miteinander zu verbinden, oder sodass diese nach oben zeigten, um den Einfluss von Scherspannungen auf eine Endothelschicht zu analysieren. Ebenfalls wurde mittels *Autodesk Inventor* eine 3D-Druck-Datei erstellt, die als Spritzform für die Silikondichtungen der Deckel bzw. des Bodens diente. Diese wurde ebenfalls in der wissenschaftlichen Werkstatt der Uniklinik mittels 3D-Extrusionsdruck hergestellt. In diese Formen wurde anschließend Zwei-Komponenten Silikon gefüllt und polymerisiert. Durch die genaue Passform der Dichtungselemente sollte einer möglichen Kontamination von außen und zusätzlich dem Austritt von Medium entgegengewirkt werden. Zur Abdichtung der Ein- und Auslässe wurden O-Ringe aus dem Werkstoff Nitril-Butadien-Kautschuk (NBR 90) mit einem Innendurchmesser von 0,88 mm und einer Schnurstärke von 0,92 mm verwendet (Dichtelemente Arcus, Seevetal). Die Komponenten des Bioreaktors wurden mit Edelstahlschrauben der Größe M3 (Conrad Electronic, Bonn) verschlossen. Um eine dynamische Kultivierung zu ermöglichen, wurden die Ein- und Auslässe mit G18 *Luer-lock*-Nadeln mit einem Innendurchmesser von 0,84 mm und einer Länge von entweder 12,7 mm (einfach Ein- und Auslass) oder 38,1 mm (doppelter Ein- und Auslass) (Nordson EFD, Dunstable, Großbritannien) ausgestattet. Diese Nadeln wurden entweder mit einem *Luer-lock* Stopfen verschlossen oder für die dynamische Kultivierung mit *Luer-lock* Schlauchadapter (Reichert Chemietechnik, Heidelberg) versehen. Für die dynamische Kultivierung wurden die Bioreaktoren mittels sauerstoffdurchlässigen, für medizinische Anwendungen zugelassenen Silikonschläuche (Innendurchmesser 1,6 mm, USP-Klasse VI, Silikonschläuche für die Medizintechnik, Silikon (Polysiloxan), Reichelt Chemietechnik, Heidelberg) an eine pneumatische Pumpe (Reglo ICC, Independent Channel Control Pumpe, Ismatec bei Darwin Microfluidics, Paris, Frankreich erworben) angeschlossen. Die 3-Stop-Schläuche aus PharMed BPT sowie die geraden Steckverbinder (Schlauch zu Schlauch) mit einem Innendurchmesser von 1,5 mm wurden von der Firma Darwin Microfluidics (Darwin Microfluidics, Paris, Frankreich) verwendet. Ebenfalls wurde für die Nährstoffversorgung ein Medienreservoir, bestehend aus einer Laborflasche mit Schraubverschluss (100 mL, VWR International, Darmstadt), Verbindungssystem Kappe mit drei Anschlüssen (Duran GL 45 connection system caps and accessories, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), einem gekürztem 15 mL Falcon (Sarstedt, Nümbrecht) und einem Sterilfilter (Corning, New York, USA), mit in den Kreislauf geschlossen. Alle Komponenten waren autoklavierbar, biokompatibel und chemikalienbeständig. Jede Komponente des Bioreaktors wurde vor dem Zusammenbau durch Autoklavieren sterilisiert.

3.1.2 Design

Für die unterschiedlichen Anwendungen gab es unterschiedliche Designs der Bioreaktoren, eine Version besaß einen Ein- und Auslass, während die andere Version zwei Einlässe und zwei Auslässe an jeweils einer Seite besaß. Abbildung 5 zeigt den ovalen Innenraum des Bioreaktors. Dieser besitzt die Maßen 29,0 x 16,4 x 9,0 mm. (L x B x H). Durch die ovale Formgebung sollte verhindert werden, dass es bei einem Druckanstieg am Einlass dazu kommt, dass Medium an den Seiten des Hydrogels entweicht, indem es das Hydrogel verdrängt. Im Querschnitt

(Abbildung 5D-G) zeigt sich der A-förmige Verlauf des Innenraums, der nach oben hin wieder gerade verläuft. Diese Verjüngung sollte gewährleisten, dass das Hydrogel auch bei einem höheren Druck innerhalb der Kanäle nach unten auf dem Deckglas gehalten wird und sich nicht von diesem ablöst. Dabei brach die Verjüngung nach oben hin ab und wurde gerade weitergeführt, um der Nadel des Extrusionsdruckers zu erlauben, nah genug an den Ein- bzw. Auslass während des Druckvorganges zu gelangen. Die Ein- und Auslässe befanden sich im Innenraum genau am Boden, oberhalb des Deckglases. Um dies zu ermöglichen, wurden die Adapter sowie die Öffnungen schräg in den Bioreaktor eingebracht, ohne dabei starke Verwinkelungen zu erzeugen (siehe Abbildung 5D-E). Die Durchmesser wurden so gewählt, dass es nicht zu Toträumen kam, da sich dort kleinere Blasen sammeln und zu größeren zusammenschließen könnten. Diese könnten in der dynamischen Kultivierung zu Änderungen der Strömungen oder sogar zu der Zerstörung der Strukturen führen.

3.1.3 Abdichtung

Eine große Herausforderung an das Design stellte die Abdichtung der einzelnen Elemente dar. Wie in Abbildung 5 schon ersichtlich wird, wurden maßgefertigte Silikondichtungen verwendet, um die Sichtfenster zuverlässig abzudichten. Dies war möglich, indem, wie in Abbildung 6A gezeigt wird, passgenaue Mulden für das Deckglas sowie die Silikondichtung in den Bioreaktorkörper eingebracht wurden. Dabei entsprach die Tiefe für die Deckgläser der mittleren Dicke eben dieser. Die Tiefe für die Silikondichtungen wurde mit 1,0 mm bemessen. Eine weitere Vertiefung von 0,9 mm befand sich für die Silikondichtung im Deckel- bzw. im Bodenelement. Die Silikondichtungen besaßen eine Dicke von 2 mm, wodurch es beim Verschließen zu einem Anpressdruck der Silikondichtung für eine bessere Abdichtung kam. Das gleiche galt für die Vertiefung der O-Ring-Dichtungen. Diese wurde so gefertigt, dass beim Einführen der Nadel (Außendurchmesser der Nadel betrug 1,27 mm) kein Spiel vorhanden war und durch das Verschrauben mit dem Adapter der O-Ring optimal angepresst und um die Nadel komprimiert wurde, sodass keine Luft mehr eindringen, bzw. Medium ausdringen konnte und die Nadel stabil im System gehalten wurde. Die genaue Bemaßung ist der Abbildung 6B zu entnehmen.

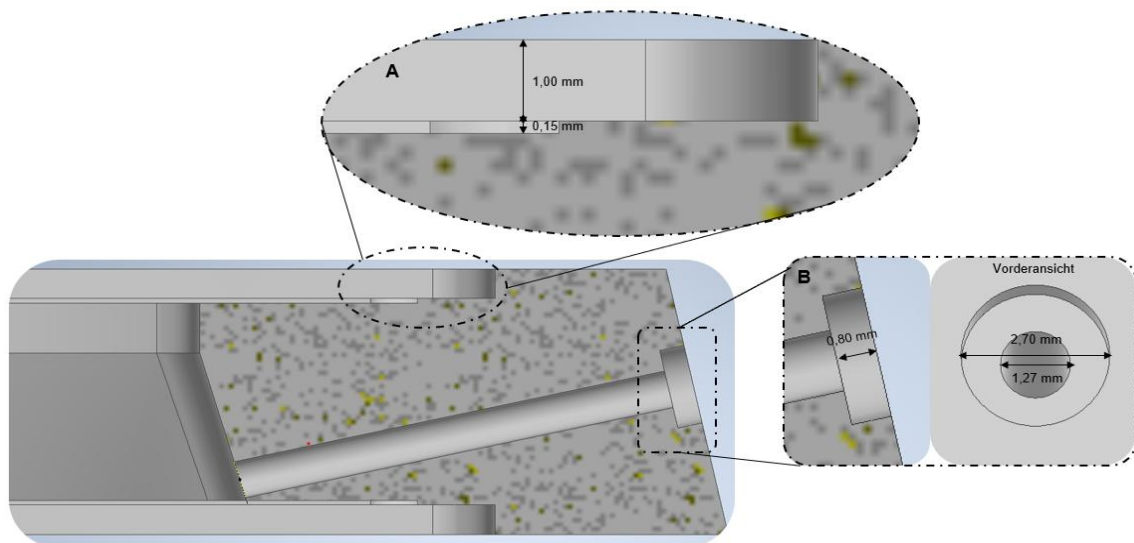


Abbildung 6: Querschnitt des Bioreaktorkörpers, sowie die jeweiligen Vergrößerungen A und B. Dabei zeigt A die Vergrößerung der Mulden für das Deckglas, sowie die Silikondichtung und die jeweiligen Bemaßungen. B zeigt die Vergrößerung der O-Ring-Vertiefung sowie die Vorderansicht und deren Bemaßungen.

3.1.4 Kanaldesign und Analyse

In der Abbildung 7 werden die unterschiedlichen Arten der entworfenen Kanäle gezeigt.

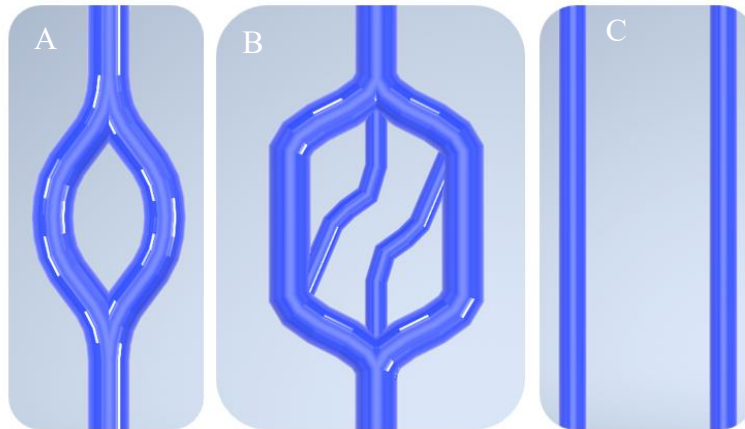


Abbildung 7: Unterschiedliche Designs der Kanalstrukturen. (A) zeigt den Doppelkanal (Design einer vorausgegangenen Arbeit [99]), während sich in der Mitte (B) die Weiterentwicklung dessen befindet (komplexer Kanal). Um der Natur näher zu kommen, wurde eine weitere Verzweigung des Doppelkanals mit einer Verkleinerung des Durchmessers eingeführt. (C) zeigt die parallelen Kanäle, die mit entgegengesetzten Durchflüssen beaufschlagt werden können. Die Designs wurden mit Autodesk Inventor erstellt. Im weiteren Verlauf wurde daraus ein G-Code für den 3D-Extrusionsbiodrucker erstellt.

Aus den vorausgegangenen Arbeiten am Lehr- und Forschungsgebiet Zahnärztliche Werkstoffkunde und Biomaterialforschung an dem Bioreaktor wurde der Doppelkanal, sowie dessen Bioreaktor übernommen und in einigen Experimenten verwendet ([99]). Des Weiteren wurde ein komplexer Kanal für den Einkanal-Bioreaktor entworfen. Dieser bestand ähnlich wie der Doppelkanal aus einem sich verzweigenden Kanal, welcher jedoch durch kleinere Kanäle erneut verzweigt wurde. Für den Zweikanal-Bioreaktor wurden zwei parallele Kanäle entworfen, die aus jeweils entgegengesetzter Richtung mit einem Durchfluss beaufschlagt werden konnten. Die Kanäle wurden zunächst mit *Autodesk Inventor* entworfen und mit der Software *Ansys* auf ihre Flussgeschwindigkeit, Wandschubspannung und Druck simuliert und analysiert¹. Nach Anpassung der Formgebung wurden die Kanalmodelle in einem G-Code übernommen, um diese dann mit dem Extrusionsdrucker drucken zu können.

Die Maße für die Simulation und den G-Code entsprachen dabei einem Kanaldurchmesser von 1,5 mm. Der Doppelkanal besaß eine Gesamtlänge von 15 mm. Der maximale Abstand, der sich verzweigenden Stränge, lag bei 4 mm im Mittelpunkt, was zu einem inneren Bereich von einer Breite von 2,5 mm und einer Länge von 5,2 mm führte. Für den komplexen Kanal hatten die beiden äußeren Stränge einen Abstand von 6 mm im Mittelpunkt, was zu einem Innenraum von 4,5 mm in der Breite und 7,9 mm in der Länge führte. In diesem befanden sich die weiter verzweigenden und schmalere Stränge, mit einem Durchmesser von 0,8 mm und einem durchschnittlichen Abstand von 2,2 mm vom Mittelpunkt. Dabei ergab sich ein Abstand der beiden schmalere Gefäße von 1,4 mm zueinander und ein Abstand von 2 mm zu den äußeren Strängen. Die Gesamtlänge des gedruckten Konstrukts betrug 14,5 mm. Das Konstrukt konnte zweifach in Reihe in den Bioreaktor gedruckt werden.

¹ Die Analyse durch die Software *Ansys* wurde von Ramin Nasehi (ZWBF) durchgeführt

Die parallelen Kanäle hatten einen Abstand von 8 mm vom Mittelpunkt, was zu einem Innenraum von 6,5 mm Breite führte. Die Länge der Stränge betrug 22,5 mm.

Die entsprechenden G-Codes sind dem Anhang zu entnehmen.

Für die Strömungsanalyse wurde jeweils der Fluss durch das gesamte Reaktorsystem simuliert (Abbildung 8)

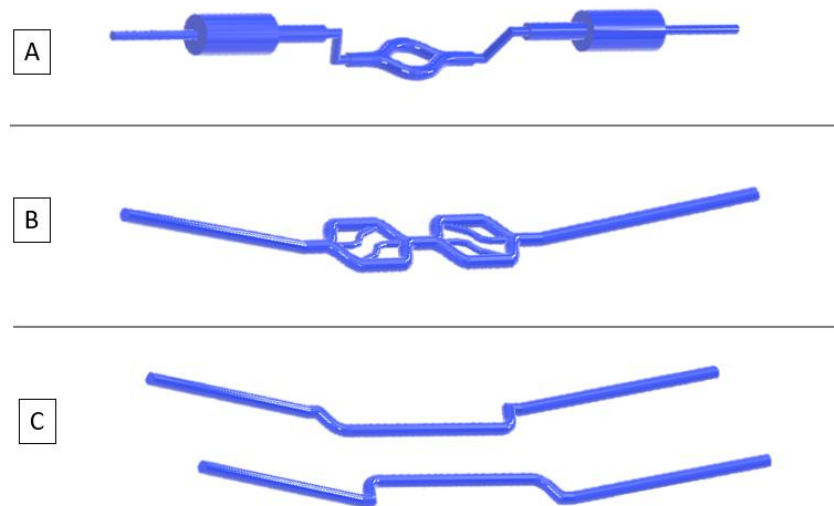


Abbildung 8: CAD-Zeichnung des gesamten Reaktorsystems für die Strömungssimulation.. A: Ursprünglicher Bioreaktor [99] mit Doppelkanal. B: Reaktorsystem mit zweifacher Kanalteilung und Querkanälen. C: zeigt die parallelen Kanäle im Doppelkanal-Bioreaktor. Die verschiedenen Kanalverläufe wurden mit Hilfe von Autodesk Inventor gestaltet.

3.2 Materialsynthese

Für die Versuche wurde zum einen Gelatine, das als Opfermaterial für die Gefäßstrukturen genutzt wurde, verwendet (Kapitel 3.2.1). Dabei wurde zwischen Gelatine mit und ohne Zellen unterschieden. Um die extrazelluläre Matrix nachzubilden, in die unterschiedliche Zelltypen eingebettet wurden, wurden die Hydrogele Kollagen, Fibrin und Kombinationen aus den beiden Gelen verwendet (Kapitel 3.2.2). Kapitel 3.2.3 beschreibt die Synthese von Pluronic, welches zum einen zum Abdichten der Konstrukte und zudem auch in der Kombination mit Gelatine als Opfermaterial für die Mikrokanäle verwendet wurde. Im letzten Kapitel wird die Herstellung von PDMS beschrieben, welches für ein weiteres Verfahren zur Herstellung von Mikrokanälen benötigt wurde.

3.2.1 Gelatine

Für die Erzeugung von Hohlstrukturen wurde Gelatine als Opfermaterial verwendet. Diese wurde zum einen ohne Zellen verwendet und wird im weiteren Verlauf Gelatine oder, bei der Verwendung mit Zellen, Biotinte genannt. Die Gelatine-Stammlösung wurde für jedes Experiment zuvor frisch vorbereitet, da sich in Vorversuchen bei Lagerung im Kühl- oder Gefrierschrank Veränderungen in der Handhabung gezeigt hatten. Zur Herstellung der

Gelatine-Stammlösung wurden 100 mg/mL porcines Gelatinepulver (Gelatine aus Schweinehaut, Typ A, gel strength 300, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zu einer 10 %-igen Lösung (w/v) in PBS (Life Technologie, Carlsbad, USA) in einen 50 mL Falcon (Sarstedt, Nümbrecht) gegeben und im Ofen bei 80 °C für acht Stunden gelöst. Die Herstellungsparameter Zeit und Temperatur wurden für unterschiedliche Anwendungen zuvor untersucht, da diese Parameter erheblichen Einfluss auf das Verhalten (Stabilität und Gelierung) im weiteren Verlauf hatten. Anschließend wurde der pH-Wert mit einer 1M NaOH-Lösung (Merk, Darmstadt) auf 7,4 eingestellt und mit einem 0,2 µm Spritzenfilter (Corning, New York, USA) steril gefiltert. Für die weitere Verwendung ohne Zellen wurde ein Teil der Stammlösung erneut eine halbe Stunde im Wasserbad bei 37 °C verflüssigt und anschließend mit warmem PBS zu einer 5 %-igen Gelatine-Lösung verdünnt und in eine Spritze (B Braun *Inkjet*, Solo Einmalspritze, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) umgefüllt. Diese wurde mit einem *Luer-lock* Stopfen verschlossen und zusammen mit der Gelatine-Stammlösung bis zur weiteren Verwendung für mindestens 24 Stunden im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

3.2.2 Kollagen und Fibrinogen sowie Kombinationen aus beiden

Für die Herstellung des Kollagen-Hydrogels wurde Kollagen G1 (5 mg/mL Solution aus Rinderkalbshaut, in 0,01 M HCl gelöst, Matrix BioScience, Mörlenbach) verwendet. Um dieses zu vernetzen, musste zunächst eine Vernetzungslösung B hergestellt werden. Dazu wurde ein Teil 0,7 M NaOH mit einem Teil 1 M HEPES-Puffer (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) gemischt, die sogenannte Lösung A. Diese Lösung A wurde dann wiederum zu gleichen Teilen mit zehnfach konzentriertem Dulbecco's Modified Eagle's Medium (10x DMEM) (Gibco by Life technologies, Carlsbad, USA) vermengt und der pH-Wert zwischen 7,9 und 8,05 eingestellt. Die so entstandene Vernetzerlösung B wurde mittels 0,2 µm Spritzenfilter steril gefiltert und bei 4 °C gelagert. Für die Vernetzung des Kollagens wurden acht Teile des Kollagen G1 mit zwei Teilen an Vernetzerlösung B vermischt, wodurch eine Kollagen-Endkonzentration von 4 mg/mL entstand. Dies geschah immer unmittelbar vor dem Einsatz der Hydrogele, wobei eine kurzzeitige Lagerung von wenigen Minuten bis maximal 15 Minuten bei 4 °C möglich war, ohne, dass eine vorzeitige Gelierung eintrat.

Um eine Fibrinogen-Stammlösung von 50 mg/mL herzustellen, wurde Fibrinogenpulver aus Rinderplasma (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) in 37 °C warmen PBS unter ständigem Rühren für 7-24 Stunden gelöst. Im Anschluss wurde die noch warme Lösung mit einem 0,2 µm Spritzenfilter steril gefiltert, in 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäß (Eppis, Sarstedt, Nümbrecht) aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren.

Eine Thrombin-Stammlösung von 100 U/mL wurde hergestellt, indem Thrombin aus Rinderplasma (10.000 U, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) in kaltem, sterilem PBS verdünnt und anschließend in 1,5 mL Eppis aliquotiert und bei -20 °C eingefroren wurde.

Zur Herstellung einer Transglutaminase-Stammlösung wurde Meat Glue Pulver (Meat Glue, Special Ingredients, Chesterfield, Großbritannien) in einer Konzentration von 60 mg/mL in PBS verdünnt und mittels 0,2 µm Spritzenfilter steril gefiltert. Anschließend wurde die Transglutaminase-Lösung in 1,5 mL Eppis aliquotiert und bei -20 °C für den weiteren Gebrauch eingefroren.

50 mg/mL Calciumchlorid (CaCl₂) (Carl Roth, Karlsruhe) wurde bei Raumtemperatur in Millipore-Wasser aufgelöst und mittels 0,2 µm Spritzenfilter steril gefiltert und ebenfalls bei -20 °C gelagert.

Für die Experimente wurden zwei unterschiedliche Kollagen-Fibrinogen-Kombinationen verwendet, die sich in der Endkonzentration des Fibrinogens unterschieden. Allgemein wurden

für die Kombinationen zwei Teile Vernetzerlösung B mit acht Teilen Kollagen G1 vermischt. Zu dieser Lösung wurden 1 % der Hydrogel-Gesamtmenge an Thrombin-Stammlösung hinzugegeben und kurzzeitig im Kühlschrank oder auf Eis gelagert. Die Fibrinogen-Stammlösung wurde mit der entsprechenden Menge an Heparin-freiem Medium verdünnt, sodass sich eine Konzentration von 5,4 oder 16,7 mg/mL ergab. Ebenfalls wurde 1 % (V/V) 100x Antibiotisch-Antimykotische-Lösung (AA), sowie für die Vernetzung 1 % (V/V) CaCl₂ und 3,33 % (V/V) Transglutaminase hinzugegeben. Im Anschluss wurden die beiden vorbereiteten Komponenten, Kollagen und Fibrinogen, zu gleichen Teilen miteinander vermischt. Dadurch ergaben sich die Endkonzentrationen von 1,9 mg/mL Kollagen und für Fibrinogen 2,5 mg/mL (CF_{low}) oder 7,8 mg/mL (CF_{high}) ein.

In dem Fall, in dem nur Fibrin verwendet wurde, wurde die Thrombin-Lösung direkt zum Fibrinogen hinzugegeben und eine Endkonzentration von 2,5 mg/mL eingestellt.

3.2.3 Pluronic

35 mg/mL Pluronic Pulver (Pluronic F-127, Sigma Aldrich, ST. Louis, USA) wurde in kaltem PBS über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gelöst. Anschließend wurden zuvor eingefrorene (-20 °C) Spritzenfilter zusammen mit Eisblocks verwendet, um die Pluronic-Lösung steril zu filtern. In einem 50 mL Falcon wurde dieses bis zum weiteren Gebrauch im Kühlschrank gelagert.

3.2.4 Polydimethylsiloxan (PDMS)

PDMS (Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit, Dow Silicones Deutschland, Wiesbaden) wurde hergestellt, indem neun Teile Monomer mit einem Teil Aushärtungsmittel in einem 15 mL Falcon unter sanftem Rühren gemischt wurden. Für die Polymerisation kann das PDMS entweder bei Raumtemperatur oder im Ofen für mehrere Stunden gelassen werden. Ebenfalls konnte das gegossene PDMS-Konstrukt in der Vakuummilch von Luftblasen befreit werden.

3.3 Hydrogel-Charakterisierung

Die hergestellten Hydrogele wurden zur Beurteilung ihrer Eignung und Unterscheidung hinsichtlich ihrer mechanischen, chemischen und strukturellen Eigenschaften untersucht. Dabei wurden Kompressionsversuche und Bestimmung des Wasserverlustes Untersuchungen (Kapitel 3.3.1 und 3.3.2) für die mechanische Analyse durchgeführt. Für die chemische Untersuchung diente die Kontaktwinkelmessung (Kapitel 3.3.3) und Kapitel 3.3.4 beschreibt die Analyse mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) zur Bestimmung der Porengröße und Faserdicke.

3.3.1 Kompressionsversuch

Für jedes Hydrogel wurden jeweils drei Proben hergestellt. Dazu wurden zunächst Plastikröhrchen mit einem Innendurchmesser von 14 mm (Röhre 13 mL, 95 x 16,8 mm, PS, Sarstedt, Nümbrecht) auf eine Länge von 15 mm zu Formen gesägt. Diese wurden nach der Säuberung von Spänen mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert und in eine Petrischale (92 x 16 mm, PS, Sarstedt, Nümbrecht) gestellt. Um zu verhindern, dass Hydrogel aus den Formen läuft, wurden diese mit Pluronic abgedichtet. Im Anschluss wurden die jeweiligen Hydrogele wie zuvor beschrieben angemischt und jeweils 1,8 mL in die Formen pipettiert (Abbildung 9) Um eine vollständige Gelierung zu gewährleisten, wurden die Formen mit den Hydrogelen mit

Parafilm (Parafilm, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) abgedichtet und im Inkubator bei 37 °C für mindestens zwei Stunden gelagert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Hydrogele aus dem Inkubator entnommen und mittels einer Universalprüfmaschine (Z2,5, Zwick, Ulm) auf ihre Druckfestigkeit hin geprüft. Dazu wurde zunächst im zugehörigen Programm die Parameter von 0,1 N Vorlast, eine Traversengeschwindigkeit von 10 mm/min und eine maximale Kraft von 9 N eingestellt. Der Prüfkörper wurde, wie in Abbildung 9B gezeigt, mittig unter dem Prüfkopf platziert, nachdem der Auflagebereich zuvor mit Sandpapier abgedeckt wurde, um beim Belasten ein Verrutschen des Prüfkörpers zu verhindern. Der Prüfkopf wurde manuell bis an die Oberfläche des Prüfkörpers herangefahren und als initiale Höhe im Programm gekennzeichnet. Die Messung wurde gestartet und endete, sobald die maximale Kraft mit anschließendem abruptem Kraftabfall verzeichnet wurde.

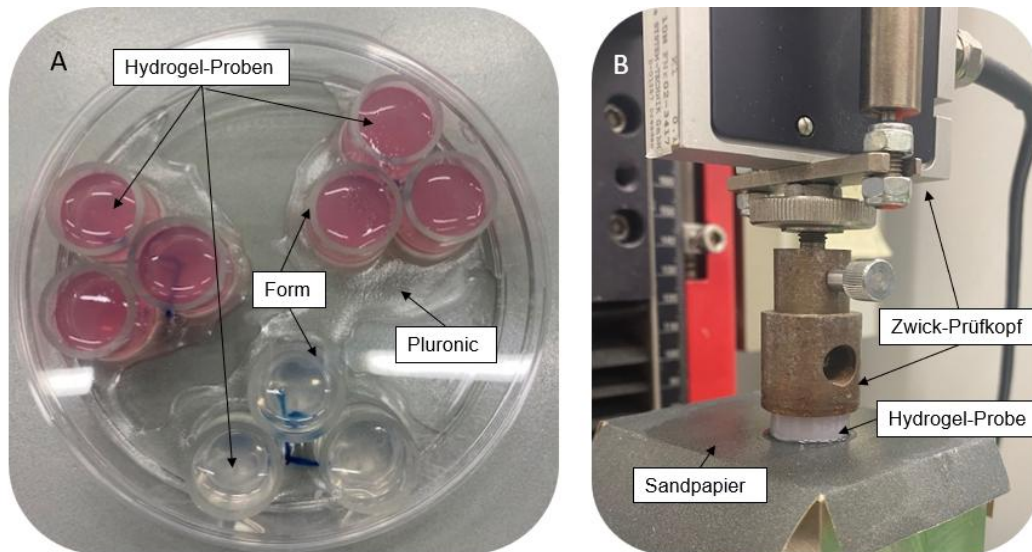


Abbildung 9: Aufbau der Probenherstellung (A) sowie der Kompressionsmessung mit der Universal-Prüfmaschine (B). A zeigt unterschiedliche Hydrogele zu jeweils drei Proben in die Formen gefüllt, die zuvor mit Pluronic abgedichtet wurden. B entspricht der Messung mit der Prüfmaschine, welche mit einer Hydrogelprobe beladen ist. Der Prüfkopf wurde bis an die Oberfläche herangefahren. Die Probe wurde zuvor auf Sandpapier platziert, um zu verhindern, dass diese durch die Kompression verrutscht.

Während des Versuches zeichnete das Programm die benötigte Kraft (in N) über den zurückgelegten Weg (in mm) auf, welche in eine Excel-Datei am Ende überführt werden konnte. Zur Auswertung der Daten wurde der E-Modul anhand der Spannung und der zugehörigen Dehnung anhand der Formel (1) berechnet. Dabei beschreibt E den Elastizitätsmodul, σ die Spannung, welche aus dem Quotienten der Kraft F und der Fläche A resultiert. ε beschreibt dabei die Dehnung aus dem Quotienten der Längenänderung Δl und der Anfangslänge l_0 . Um die verschiedenen Hydrogele vergleichen zu können, wurden die Werte des Tangentenmoduls im Bereich von 5-10 % der initialen Höhe berechnet und als Elastizitätsmodul E in dieser Spanne in einem Diagramm gegenübergestellt.

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} ; \text{ mit } \sigma = \frac{F}{A} \text{ und } \varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \quad (1)$$

3.3.2 Wasserverlust-Analyse

Um den jeweiligen Wasserverlust der einzelnen Hydrogele zu messen, wurden die Proben vor und nach der Kompression gewogen. Die Werte wurden notiert, der Mittelwert, sowie die Standardabweichung aus jeweils drei Proben ($n = 3$) berechnet und in einem Diagramm zum Vergleich gegenübergestellt.

3.3.3 Kontaktwinkelmessung

Der Kontaktwinkel einzelner Oberflächen wurde fotografisch aufgenommen, indem zunächst eine dünne Schicht des jeweiligen Hydrogels auf Deckgläser durch Pipettieren aufgetragen wurde. Diese Proben wurden zur vollständigen Gelierung für eine Stunde in einem Inkubator bei 37 °C gelagert. In der Zwischenzeit wurden ebenfalls Deckgläser mit Poly-L-Lysin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) benetzt und anschließend schräg in einer Petrischale bei Raumtemperatur zum Abtropfen und Trocknen aufgestellt. Alle weiteren Materialien, wie die Deckgläser selbst oder PEEK benötigten keine weitere Vorbereitung. Für die Kontaktwinkelmessung wurden nun alle Materialien in einer Fotobox platziert. Die Kamera (EOS 2000D, Canon Deutschland, Krefeld) wurde mit einem Stativ direkt vor den Materialien platziert. Das jeweilige Material, das aufgetropft werden musste, wurde vorbereitet. Jeweils ein Tropfen mit 10 μL Volumen des zu untersuchenden Materials wurde auf die vorbereitete Oberfläche getropft und mit einem Zoomobjektiv (EF-S 18-55, Canon Deutschland, Krefeld) aufgenommen. Mit der Software *Fiji* (Image J, Bethesda, Maryland, USA) wurden die Kontaktwinkel ausgewertet, indem der Winkel, den der Tropfen zur Oberfläche auf der rechten und linken Seite bildete, bestimmt wurde.

3.3.4 Rasterelektronenmikroskopische Analyse (REM)

Um die Porengröße und Faserverteilung der einzelnen Hydrogelzusammensetzungen zu definieren, wurden diese zunächst wie zuvor beschrieben hergestellt. Anschließend wurden 100 μL auf einen PEEK-Löffel, welche zuvor in die 48er Wells (Tissue culture plate 48 well standard, Sarstedt, Nümbrecht) eingeführt wurde, pipettiert und zur vollständigen Gelierung in den Inkubator gegeben. Zu jedem zu untersuchenden Zeitpunkt, wurden die Proben mit einem 3 Vol.-% Glutaraldehyd-PBS-Puffer fixiert und in der Abteilung für Elektronenmikroskopie des Universitätsklinikums RWTH Aachen gegeben. Dort wurden die Proben von Stefan Rütten mit der kritischen Trocknung vorbereitet und im Anschluss mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht. Die Bilder wurden dann im Anschluss mit FIJI weiter bezüglich ihrer Porengröße und Faserverteilung analysiert und ausgewertet.

Ebenfalls wurden Proben zur genaueren Ansicht der Zellbesiedlung für die Endothelialisierung (Kapitel 3.5.1) auf diese Weise fixiert, vorbereitet und analysiert.

3.4 Zellbiologische Experimente

Um die Eignung der Hydrogele im statischen sowie den Einfluss von Scherspannungen während der dynamischen Kultivierung zu testen, wurden unterschiedliche Zellen für die Experimente verwendet. Kapitel 3.4.1 beschreibt dabei die Kultivierung der einzelnen Zellarten, sowie das Vorgehen beim Vermischen mit den Hydrogelen. In Kapitel 3.4.2 wird die Herstellung der Tumorsphäroide beschrieben, die in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Experimentelle Molekulare Bildgebung der RWTH Aachen hergestellt und in den

Experimenten verwendet wurde. Um das Zellverhalten im Anschluss zu analysieren, wurden Lebend-/Tot-Färbungen (Kapitel 3.4.3) sowie Messungen der metabolische Aktivität (Kapitel 3.4.4) durchgeführt. Die anschließende Mikroskopie wird genauer beschrieben in Kapitel 3.4.5.

3.4.1 Zellkultur

Alle Zellarten wurden unter den Standard-Zellkulturbedingungen von 37 °C, 5 % CO₂, sowie mindestens 90 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Wenn nicht anders beschrieben, wurde dreimal pro Woche das entsprechende Medium gewechselt. Die Zellen wurden passagiert, sobald sie circa 80 % Konfluenz erreicht hatten.

Primäre GFP-HUVECs wurden von der Firma Hölzl erworben (GFP-Expressing Human Umbilical Vein Endothelial Cells, Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln). Für die Kultivierung wurde entweder das Endothelzellkulturmedium Vasculife (Vasculife VEGF Endothelial Medium Complete Kit, Lifeline Cell Technology, Frederick, USA) oder EBM-2 (EBM-2, Lonza, Basel, Schweiz) mit Wachstumsfaktoren (EGM-2 BulletKit, Lonza, Basel, Schweiz) verwendet. GFP-HUVECs wurden maximal bis zur Passage zehn verwendet.

Für einige Versuche wurden ebenfalls primäre HUVECs in den Laboren des ZWBFs isoliert. Dazu wurden zunächst fünf T75 Zellkulturflaschen mit 2 %-iger Gelatine beschichtet. Dazu wurden 2 g Gelatine Pulver (Typ B, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) in 100 mL MilliQ Wasser gelöst und autoklaviert. Jeweils 5 mL der Gelatine wurde in die Zellkulturflaschen gegeben, gleichmäßig verteilt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten stehen gelassen. Die übrig gebliebene Gelatine konnte anschließend abgesaugt werden. Aus der frischen Nabelschnur von Neugeborenen wurden die Endothelzellen isoliert, indem diese zunächst mit PBS gewaschen und durch eine Kanüle mit Olive gespült wurde, um Blutreste zu entfernen. Die Kanülen wurden auf beiden Seiten der Vene fixiert und von einer Seite mit einer Collagenase-Lösung (Collagenase Typ I, 1 mg/mL in Hank's Balanced Salt Solution mit CaCl₂ und MgCl₂, Gibco, Carlsbad, Kalifornien, USA) befüllt. Die Enden wurden mit *Luer-lock*-Stoppfern (B.Braun, Melsungen) verschlossen und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde erneut mit 20 mL PBS gespült, wobei die Collagenase-Lösung und das PBS in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt wurde. Dieses wurde anschließend für fünf Minuten bei 1200 U/min (Himac CT6E1, Hitachi Koki, Tokio, Japan) bzw. 1312 U/min (Eppendorf Centrifuge 5810, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA ab 2022) zentrifugiert, um den Überstand abzunehmen. Das zurückgebliebene Zellpellet wurde dann auf die zuvor beschichteten T75 aufgeteilt und mit 10 mL EBM-2 Medium inklusive Wachstumsfaktoren bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Isolation der Zellen aus der Nabelschnur wurde unter der schriftlichen Zustimmung der Mütter und nach den Richtlinien der Ethikkommission der RWTH Aachen (EK 218/14) durchgeführt.

Die Zelllinie HepG2 (DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Culture, Braunschweig) wurde als Zelltyp der Hepatozyten gewählt und mit dem Medium RPMI 1640 (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und 10 % fetalem Rinderserum (FBS) (Gibco, Thermo Fisher, Waltham, USA) und 1 % Penicillin/Streptomycin (PS) (PAN Biotech, Aidenbach) kultiviert und maximal bis zur Passage 12 verwendet. Zum Teil wurden die HepG2 Zellen vor den Versuchen in den Zellkulturflaschen mit Vybrant rot eingefärbt, um sie im Verlauf der Experimente im Bioreaktor sichtbar zu machen. Dazu wurde pro ein Milliliter Medium, 5 µL Vybrant hinzugegeben. Das Medium in der Zellkulturflasche wurde entnommen und das Vybrant-Medium-Gemisch hinzugefügt und für 20 Minuten bei 37 °C im Inkubator inkubiert. Nach Ablauf der Zeit, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden drei Mal für jeweils 10 Minuten mit vorgewärmten PBS gewaschen. Nach der letzten Waschung konnten die Zellen wie gewohnt für den weiteren Versuch trypsiniert und weiterverwendet werden.

Primäre Fibroblasten des peridontalen Ligaments (PDLF) wurden von der Firma Lonza (Lonza, Basel, Schweiz) gekauft und als Stromalzelle zur Unterstützung der Gewebearten verwendet. Zur Kultivierung wurde Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) (DMEM High Glucose, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) mit der Zugabe von 10 Vol.-% FBS (Gibco, ThermoFisher, Waltham, USA), 1 Vol.-% PS, 2 Vol.-% L-Glutamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und 50 mg/L L-Ascorbinsäure (L-Ascorbinsäure 2-phosphate Sesquimagnesiumsalz, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verwendet. Die Zellen wurden bis zur Passage 18 verwendet.

Für die Verwendung der Zellen in Experimenten, mussten diese zunächst durch Zentrifugieren in einen Zellpellet überführt werden. Dazu musste zunächst das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt werden und diese mit warmen PBS gewaschen werden, um Rückstände des Mediums und restliches FBS zu entfernen. Nach Entnahme des PBS, wurden entweder 2 oder 3 mL Trypsin in die T75 oder T125 Zellkulturflasche gegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Für alle Zelltypen, bis auf die HepG2 Zellen, wurde 0,05% Trypsin (Gibco™ Trypsin-EDTA, Fisher Scientific, Schwerte) für zwei Minuten bei 37 °C inkubiert, während für die HepG2 Zellen, 0,25 % Trypsin (Gibco Trypsin-EDTA phol red, Fisher Scientific, Schwerte) für 4 Minuten verwendet wurde. Dieses bewirkte die Ablösung der Zellen vom Zellkulturflaschenboden. Nach Ablauf der Zeit, wurde das Trypsin inaktiviert, indem 8 oder 7 mL des Mediums mit FBS hinzugegeben wurde und mit einer 10 mL Glaspipette (Sarstedt, Nümbrecht) vorsichtig gemischt und anschließend in eine 50 mL Flask überführt wurde. 10 µL wurden für die Zellzählung in ein Eppi überführt und mit 10 µL Typan Blue vermischt. Jeweils 10 µL dieser Zell-Lösung wurden dann in die Kammern der Zählkammern gegeben und im Countess™ II FL Zählautomaten ausgewertet. Dabei wurde aus der Doppelbestimmung der Mittelwert der lebenden Zellen als Ausgangswert der enthaltenen Zellen im Pallet gewählt. Alle Utensilien für die Zellzählung, Färbung, Kammern und Gerät sind von Invitrogen (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die Flask mit der Zellsuspension wurde mit passendem Gegengewicht in der Zentrifuge platziert und für fünf Minuten bei 1200 U/min (Himac CT6E1, Hitachi Koki, Tokio, Japan) bzw. 1312 U/min (Eppendorf Centrifuge 5810, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA ab 2022) zentrifugiert. Danach konnte der Überstand vorsichtig abgenommen werden und der Zellpellet mit der entsprechend benötigten Menge an Medium resuspendiert und mit dem jeweiligen Hydrogel gemischt werden. Dabei war darauf zu achten, dass bei der Verwendung von EGM-2 Medium, eine Heparin-freie Variante verwendet wurde, da das Heparin der Gegenspieler des Thrombins ist. Dies würde dazu führen, dass Hydrogele mit Fibrinogen-Anteil nicht gelieren würden.

3.4.2 Tumorsphäroide

Die Tumorsphäroide wurden vom Institut für Experimentelle Molekulare Bildgebung der RWTH Aachen (ExMI, Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Fabian Kießling), genauer von Frau Federica De Lorenzi, hergestellt. Diese bestanden aus epidermoidalen Plattenepithelkarzinomzellen A431 (ATCC, Manassas, VA) und Fibroblasten und wurden durch die *Hanging-Drop*-Technik oder *Liquid-Overlay*-Technik in Ultra-low Attachment Well-Platten (ULA-Platten, Corning, New York, USA) zu Sphäroiden geformt. Dazu wurden 0,5 Millionen Zellen pro Milliliter (1:4 Krebszellen zu Fibroblasten Verhältnis) in Medium resuspendiert und jeweils 20 µL Tropfen entweder in den Deckel einer 96-Well Platte (*Hanging-Drop*) oder in eine ULA-Platte (*Liquid-Overlay*) pipettiert. Für die *Hanging-Drop*-Technik wurde der Deckel dann um 180 ° gedreht, um die Well-Platte zu verschließen. Um die Austrocknung zu verhindern, wurden 50 µL PBS in die Wells der Platten hinzugefügt und für 3-5 Tage im Inkubator kultiviert. Aufgrund von Gravitationskräften, aggregieren die Zellen zu Sphäroiden an der Medium-Luft-Grenze. Nachdem Sie eine Größe von ca. 300–500 µm erreicht hatten, konnten sie für die Experimente verwendet werden.

3.4.3 Lebend/Tot-Färbung

Zur Analyse des Überlebens von Zellen, wurde eine Lebend/tot-Färbung mit dem Kit von Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Dazu wurde pro Milliliter Medium zwei Milliliter Ethidium-Homodimer-1 (EthD-1) (2 mM Stammlösung) für die Tot-Färbung, sowie 0,5 μL Calcein AM (4 mM Stammlösung) für die Lebend-Färbung und 0,5 μL Hoest für die Färbung des Nukleis gemischt. Diese Lösung wurde dann auf die Probe gegeben und für 30–45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Lösung entnommen, die Probe drei Mal mit PBS gewaschen und direkt mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager.M2, Zeiss, Oberkochen) ausgewertet.

3.4.4 Metabolische Aktivität

Mit Hilfe des Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Dojindo Laboratories, München) konnte die metabolische Aktivität der Zellen bestimmt werden. Dabei wird das im Kit enthaltene wasserlösliche Tetrazolium-Salz 8 durch eine Bioreduktion in den lebenden Zellen in einen wasserlöslichen Formazan-Farbstoff umgewandelt. Dazu wurde das Reagenz im Verhältnis 1:10 mit dem entsprechenden Medium gemischt und jeweils 200 μL auf die Probe pipettiert. Zusätzlich wurde für jede Probe noch eine Kontrolle ohne Zellen hergestellt um diese in der späteren Auswertung als Hintergrundsignal vom eigentlichen Wert zu subtrahieren. Die Proben wurden mit dem Reagenz für 2 Stunden (2D-Versuche) oder 4 Stunden (3D Versuche) im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 100 μL Überstand in eine 96-Well Platte gegeben, um direkt im Anschluss (innerhalb 10 Minuten) die Absorption im SpectraMax M (Molecular Devices, San José, USA) bei einer Wellenlänge von 450 nm zu lesen.

Eine weitere Methode zur Bestimmung der metabolischen Aktivität bzw. der Proliferation ist die Analyse mittels Cell-Titer-Blue. Dazu wurde zunächst das Medium der Proben erneuert und ebenfalls als Hintergrundprobe ein leeres Well mit Medium befüllt. Dann wurden 20 μL pro 100 μL Medium des Cell-Titer-Blue Reagenz (Promega, Walldorf) hinzugefügt und für eine Stunde bei 37 °C im Inkubator inkubiert. Nach Ablauf der Zeit, wurden 100 μL der Lösung der Wellplatten in eine schwarze 96-Well Platte überführt und die Absorption mit dem *SpectraMax* gemessen. Die Messung erfolgt immer in Doppelbestimmung pro Probe und wird im Anschluss gemittelt, nachdem die Hintergrundabsorption der Kontrolle subtrahiert wurde.

Für die Hepatozyten HepG2 wurde die metabolische Aktivität dazu durch die Messung von produziertem Albumin bestimmt. Dazu wurde das Bromocresol Green (BCG) Albumin Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verwendet. In dem Kit enthalten ist neben dem Reagenz ein Albumin Standard (5 g/dL), zur Herstellung der Standardkurve. Für diese wurde zunächst der Standard wie in Tabelle 1 gezeigt verdünnt und jeweils 5 μL in eine 96-Well Platte überführt. 200 μL des Reagenzes wurde hinzugefügt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde die Absorption bei 620 nm gemessen und die Werte in eine Excel-Tabelle überführt und in einem Diagramm geplottet.

Tabelle 1: Werte zur Erstellung einer Standardkurve mit der die gemessenen Werte verglichen werden.

Standard	Albumin Standard	Millipore Wasser	BSA
1	100 µL	0 µL	5 g/dL
2	80 µL	20 µL	4 g/dL
3	60 µL	40 µL	3 g/dL
4	40 µL	60 µL	2 g/dL
5	30 µL	70 µL	1,5 g/dL
6	20 µL	80 µL	1 g/dL
7	10 µL	90 µL	0,5 g/dL
Blank	0 µL	100 µL	0 g/dL

Für die eigentliche Albumin-Messung, wurde 24 Stunden zuvor immer das Medium der Proben gewechselt. Ebenfalls wurde immer eine leere Probe (Hydrogel ohne Zellen) mit inkubiert und diente später als Hintergrundsignal-Kontrolle, welche von den gemessenen Werten abgezogen werden musste. Für die Messung wurden wie zuvor auch mit der Standardlösung verfahren, 5 µL der Probe entnommen, in eine 96-Well Platte überführt und fünf Minuten nach der Zugabe von 200 µL Reagenz bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Absorption gemessen und in die Excel-Datei übernommen. Die gemessenen Werte, wurden nach Abzug der Absorption der Hintergrundprobe mit der Standardkurve abgeglichen, um daraus den Wert des vorhandenen Albumins zu bestimmen.

3.4.5 Immunofluoreszenzfärbung und Mikroskopie

Die Proben mussten für die weitere Analyse zunächst in kaltem 4 % (V/V) Paraformaldehyd (PFA) (16 % Formaldehyd (w/v), methanolfrei, Thermo Fisher, Waltham, USA) fixiert werden. Zuvor wurden die Proben für 10 Minuten mit kaltem PBS gewaschen und dann über Nacht mit ausreichend PFA bedeckt und unter dem Abzug gelagert. Am nächsten Tag musste das PFA 3-mal für jeweils 10 Minuten mit frischem PBS ausgewaschen werden. Anschließend musste das PBS entnommen und eine 0,2 %ige Triton X-100 (Triton X-100, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), gelöst in PBS, für 30 Minuten hinzugegeben werden. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Blockierungslösung 3 Gew.-% bovines Serumalbumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung der Blockierungslösung konnte der primäre Antikörper verdünnt in 3 % BSA wie in Tabelle 2 angeben zu den Proben hinzugegeben werden und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert werden. Bei der Verwendung von Actin-Phalloidin, wurde dieser Antikörper ebenfalls zu den primären Antikörpern hinzugefügt. Dieser ist jedoch bereits mit einem fluoreszierenden Farbstoff konjugiert und benötigt keinen sekundären Antikörper. Am nächsten Morgen wurden die primären Antikörper-Lösungen entfernt und die Proben dreimal mit PBS für zehn Minuten gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde wie in Tabelle 2 beschrieben in BSA gelöst und zu den Proben unter Abschirmung von Licht hinzugegeben. Die Proben wurden vor Licht geschützt in Aluminiumfolie verpackt bei Raumtemperatur für drei Stunden inkubiert. Anschließend wurde der Antikörper entfernt und erneut die Proben dreimal für zehn Minuten mit PBS gewaschen. Das PBS wurde entfernt und der Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Carl Roth, Karlsruhe) (1:3000 in PBS gelöst) wurde für 30

Minuten bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt hinzugegeben. Nach Ablauf der 30 Minuten, konnten die Proben ein letztes Mal dreimalig für zehn Minuten mit PBS gewaschen werden und dann entweder direkt mikroskopiert oder in PBS bei 4 °C im Kühlschrank gelagert werden.

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten primären und sekundären Antikörper, sowie ihre Verdünnungen, Farbe und Herkunft.

Primärer Antikörper			
Antikörper	Verdünnung	Firma	
HIF α (mouse)	1:250	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	
AFP (mouse)	1:250	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	
MRP2 (rabbit)	1:250	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	
Albumin (rabbit)	1:20	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	
FAK (mouse)	1:250	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	
VE-Cadherin (mouse)	1:250	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	
Actin-Phalloidin	1:250	Alexa Fluor 488 Phalloidin, Thermo Fisher, Waltham, USA	
Sekundärer Antikörper			
Antikörper	Verdünnung	Farbe	Firma
AlexaFlour 555 (donkey anti mouse)	1:2000	Rot	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
AlexaFlour 555 (donkey anti rabbit)	1:2000	Rot	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
AlexaFlour 488 (goat anti mouse)	1:2000	Grün	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
AlexaFlour 488 (goat anti rabbit)	1:2000	Grün	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.5 Endothelialisierung

Ziel bei der Endothelialisierung ist es, eine konfluente einlagige Auskleidung von Endothelzellen der Innenwand der Gefäße zu erhalten, die auch über eine lange dynamische Kultivierungszeit stabil bleibt. Um die Endothelialisierung zu optimieren, wurden zuvor "2,5D"-Versuche in einer Wellplatte durchgeführt. Dabei wurden unterschiedliche Hydrogele miteinander verglichen. Ebenfalls wurden unterschiedliche Zeitpunkte der statischen Kultivierung ausgewertet, um diese im Anschluss in die dynamische Kultivierung zu überführen. Dazu wurde der zuvor beschriebene Bioreaktor (Abbildung 5) um 180° gedreht verwendet.

3.5.1 Statische Endothelialisierung

Um das richtige Hydrogel für die Endothelialisierung, sowie den richtigen Zeitpunkt für die dynamische Kultivierung zu bestimmen, wurden die beiden Kollagen-Fibrinogen-Kombinationen CF_{low} und CF_{high}, sowie 2,5 %-iges Fibrin wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben angefertigt und 200 μ L/Well in eine 48er-Wellplatte (Tissue culture plate 48 well standard, Sarstedt, Nümbrecht) gegeben. Nach 30-minütiger Gelierung bei Raumtemperatur wurden 0,1 $\times 10^6$ GFP-HUVECs in 250 μ L EGM-2 Medium pro Well ausgesät. Die Wellplatte wurde bei

37 °C und 5 % CO₂ für maximal 72 h inkubiert und ein Mediumwechsel fand nach jeweils 24 Stunden statt. Nach 3 h, 24 h, 48 h und 72 h wurden jeweils zwei Proben fixiert, nachdem das Medium vorsichtig abgenommen wurde und die Proben mit PBS gewaschen wurden. Anschließend wurden die Proben auf VE-Cadherin und FAK untersucht und miteinander verglichen. Für eine Rasterelektronenmikroskopische Analyse, wurden die Proben auf CF_{high} und 2,5 %-igem Fibrin zusätzlich für insgesamt neun Tage kultiviert und zum Zeitpunkt Tag 1, 3, 6 und 9 mit dem passenden Puffer (siehe Kapitel 3.3.4) fixiert.

3.5.2 Dynamische Endothelialisierung

Der dynamische Einfluss auf eine Endothelschicht bei der Durchströmung durch die dabei auftretenden Scherspannungen wurde analysiert, indem der zuvor beschriebene Bioreaktor um 180 ° gedreht wurde. Der Ein- bzw. Auslass befanden sich dadurch oberhalb (Abbildung 10). Dazu wurde der beste Kandidat des Hydrogels aus dem statischen Versuch in den Bioreaktor gefüllt, sodass es gerade bis unterhalb des Ein- bzw. Auslasses endete. Anschließend hatte das Hydrogel eine Stunde Zeit vollständig bei 37 °C zu gelieren. Um eine geschlossene GFP-HUVECs Schicht auf dem Hydrogel zu erhalten, wurden $0,3 \cdot 10^6$ Zellen pro Bioreaktor auf das Hydrogel pipettiert und für drei Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen, um für jeden Zeitpunkt den gleichen Ausgangspunkt zu haben. Der Bioreaktor wurde dann mit vorgewärmtem EGM-2 Medium blasenfrei und vollständig gefüllt. Für jeden Zeitpunkt wurde ein Reaktor an die Pumpe zur dynamischen Kultivierung angeschlossen, nachdem der Startpunkt unter dem Fluoreszenzmikroskop bildlich festgehalten wurde. Die dynamische Kultivierung fand nach 3, 24 und 72 Stunden statt, wobei dann 24 Stunden lang, ein Durchfluss von 0,4 mL/min und im Anschluss weitere 24 Stunden mit 0,8 mL/min eingestellt wurde. Zu jedem Zeitpunkt wurde durch das obere Mikroskopiefenster des Bioreaktors Bilder mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Ebenfalls wurde zuvor der Innenraum des Mediums mit der Software Autodesk Inventor nachgestellt, um die Scherspannungen auf die HUVECs-Schicht unter dynamischer Kultivierung mit der Software Ansys zu simulieren.

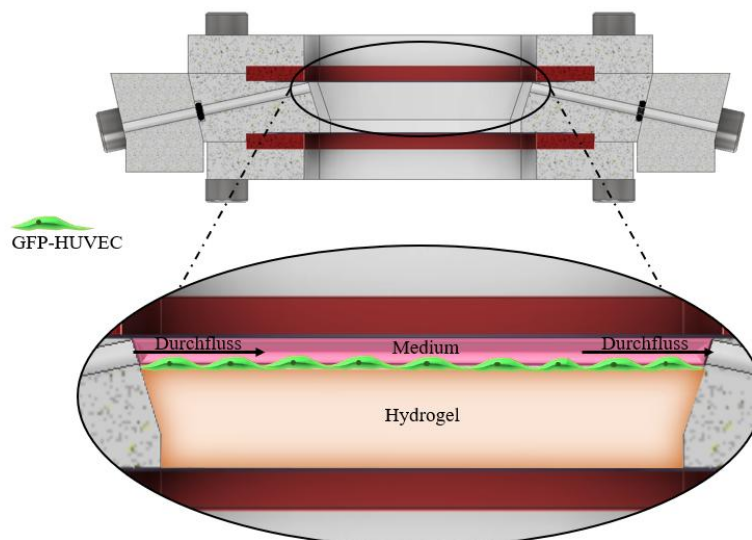


Abbildung 10: Schematischer Aufbau der dynamischen Endothelialisierung zur Untersuchung des Durchflusses und der dabei auftretenden Scherspannungen auf eine GFP-HUVECs Schicht.

3.6 Der 3D-Biodruck-Prozess

Um ein komplexes Model aus den zuvor gesammelten Daten zu erhalten, wurde der Mikroextrusionsdrucker sowie die zuvor beschriebenen Bioreaktoren im dynamischen Kreislauf verwendet. Dazu waren weitere Voruntersuchungen, sowie Vorbereitungen notwendig, die im Weiteren genauer beschrieben werden. Dabei war es ebenfalls wichtig, die Einflüsse unterschiedlicher Parameter, die während des Experimentes auftreten, zu bestimmen und um sicher zu gehen, die verwendeten Zellen durch den Prozess nicht zu schaden.

3.6.1 Beschichtung der Deckgläser

Um die Adhäsion der Hydrogele an den Deckgläsern der Bioreaktoren zu verbessern, wurden diese beschichtet. Dazu wurde die Kollagen-Fibrin-Mischung in hoher Konzentration (CF_{high}) wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben präpariert. Auf die Zugabe von Thrombin wurde jedoch verzichtet, um eine schnelle Gelierung zu verhindern. Im Anschluss wurde mittels Pipette eine ausreichende Menge des Materials auf autoklavierte Deckgläser gegeben. Dabei war zu beachten, dass die Schicht nur sehr dünn aufgetragen werden sollte. Um überschüssiges Material loszuwerden, wurden die Deckgläser bereits beim Pipettieren im 45° Winkel gehalten und auch im Anschluss zum vollständigen Gelieren schräg in zugedeckten Petrischalen bei 37°C im Inkubator gelagert. Die Vorbereitung der Deckgläser erfolgte einen Tag vor dem Zusammenbau der Bioreaktoren.

3.6.2 Herstellung der Biotinte

Zur Herstellung der Biotinte wurde die Gelatine-Stammlösung eine halbe Stunde bei 37°C im Wasserbad verflüssigt. Für eine Endkonzentration von 3 Mio. GFP-HUVECs pro Milliliter, wurde der zuvor hergestellte Zellpellet mit $300\ \mu\text{L}$ warmen PBS resuspendiert und mit $700\ \mu\text{L}$ Gelatine-Stammlösung zu einer 7 %-igen Biotinte vermengt. Diese wurde im Anschluss in eine Spritze (BD 10 mL Spritze mit *Luer-lock* Spitze, Becton, Dickinson and Company, Temse, Belgien) umgefüllt und mit einem *Luer-lock* Stopfen verschlossen. Der Kolben der Spritze wurde zuvor gekürzt, um Platz für den Druckluftstutzen des Extrusionsdruckers zu schaffen, welcher für den Druckprozess von hinten an die Spritze angebracht wird. Die Biotinte musste dann für eine Stunde im Kühlschrank gelagert werden, um eine vollständige und ausreichende Gelierung zu gewährleisten.

3.6.3 Einfluss der Kühlung auf die Endothelzellen

Um zu überprüfen, ob die Kühlung der Biotinte bei 4°C für eine Stunde einen Einfluss auf die Endothelzellen hatte, wurde die Biotinte, wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben, hergestellt. Nach der Entnahme aus dem Kühlschrank wurde die Biotinte für 30 Minuten bei 37°C in einem Wasserbad verflüssigt. $10\ \mu\text{L}$ der Biotinte (entsprechen $0,03 \cdot 10^6$ Zellen) wurde im Anschluss in eine 48-Well Platte pipettiert. In diese wurde zuvor $200\ \mu\text{L/Well}$ ECM-nachbildende Hydrogele gegeben und geliert. Die Proben wurden insgesamt für sieben Tage kultiviert, wobei alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel von $200\ \mu\text{L}$ EGM-2 Medium stattfand. Die Proben wurden an Tag 1, 3 und 7 fixiert, angefärbt und mikroskopiert.

3.6.4 Vorbereitung des 3D-Biodruckers und der Bioreaktoren

Um eine ausreichend saubere Umgebung innerhalb des 3D-Biodruckers zu gewährleisten, wurde eine Stunde vor Beginn des Druckvorganges das Filtersystem (Spetec, Erdingen) des 3D-Druckers eingeschaltet. Ebenfalls wurde der Innenraum zuvor mit 70 %-igem Ethanol gereinigt. Um zu verhindern, dass sich während des Druckvorganges die Gelatine verflüssigt, wurde die Druckplattform auf 4 °C vorgekühlt. Dazu wurde das Kühlsystem ebenfalls eine Stunde vor Beginn auf 4 °C eingestellt und gestartet.

Die Bioreaktoren wurden zuvor autoklaviert und für eine Stunde im Ofen bei 100 °C getrocknet, um sicherzugehen, dass sich kein Kondenswasser in den Kanälen befand. Dann wurden die Reaktoren unter der Lamina mit den beschichteten Deckgläsern aus Kapitel 3.6.1 wie in Abbildung 10 gezeigt zusammengebaut. Zunächst wurde aber der Deckel offengelassen. Um eine optimale Verbindung der später gedruckten Strukturen mit den Ein- bzw. Auslässen des Reaktors herzustellen und um Lufteinschlüsse zu minimieren, wurde Gelatine (ohne Zellen) durch die Nadeln in die Reaktoren gespritzt, bis eine kleine Spitze aus dem Einlass zu sehen war. Die Nadeln des Reaktors wurden mit *Luer-Lock* Stopfen verschlossen, der Deckel des Reaktors wurde verschlossen und zur Lagerung bis zum Druckprozess im Kühlschrank gehalten.

3.6.5 Bestimmung der Anhaftungszeit

Nach dem Verdrucken der Biotinte in den gewünschten Strukturen, wurden diese, wie im nächsten Kapitel beschrieben, zunächst mit dem ECM-nachbildenden Hydrogel umhüllt und im Anschluss an die Gelierung um 180 ° gedreht im Inkubator kurzzeitig gelagert, damit die Gelatine sich verflüssigt und die Zellen in der Gelatine zur Grenzschicht wandern und anhaften können. Zur Bestimmung eben dieser Anhaftungszeit, wurden "2,5D"-Versuche in Wellplatten auf den unterschiedlichen Hydrogelen durchgeführt. Dazu wurden zunächst 250 µL der Hydrogele in 48-Well Platten pipettiert und vollständig geliert. Im Anschluss wurde die Biotinte, wie zuvor beschrieben aus dem Kühlschrank entnommen und für 30 Minuten im 37 °C warmen Wasserbad erneut verflüssigt. Dann wurden 100 µL eben dieser in die jeweiligen Wells gegeben, dies entsprach einer Zellzahl von $0,3 \cdot 10^6$ Zellen pro Well. Es wurde kein weiteres Medium in die Wells gegeben, um die Situation bestmöglich der im Bioreaktor nachzuempfinden. Die Wellplatte wurde dann im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Dann wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (zwei, drei und vier Stunden) die restliche Gelatine für jeden Zeitpunkt und jedes Hydrogel entsprechend abgenommen, einmalig mit PBS gewaschen und die Proben fixiert und für die Immunostaining Analyse auf fokale Adhäsionspunkte (FAK, siehe Tabelle 2) und VE-Cadherin hin vorbereitet und mikroskopiert.

3.6.6 3D-Biodruck der Gefäßstrukturen

Die aus Kapitel 3.6.2 beschriebene Spritze wurde aus dem Kühlschrank herausgenommen, der *Luer-Lock* Stopfen wurde durch eine G20 Nadel (Innendurchmesser 0,61 mm und Länge 12,7 mm, Nordson EFD, Dunstable, Großbritannien) unter der Lamina ausgetauscht und an den Druckluftstutzen des Extrusionsdruckers angeschlossen. Die Bioreaktoren wurden aus dem Kühlschrank geholt und auf der gekühlten Druckplattform platziert. Der Mikroextrusionsdrucker wurde manuell über die Drucksoftware in den Bioreaktor geführt, sodass die Nadelspitze genau an der Gelatine-Spitze des Einlasses platziert wurde, ohne dabei das Deckglas zu berühren. Der entsprechende G-Code (siehe Anhang) wurde in das Programm geladen und der Startpunkt gespeichert. Um den passenden Druck der Druckluft einzustellen,

wurde der Druckkopf erneut hochgefahren und unterschiedliche Drücke getestet, indem in eine Petrischale unterhalb gedruckt wurde. Sobald der Gelatine-Strang fließend und gleichmäßig floss, konnte der Druckkopf erneut zum Startpunkt gefahren und der Druckprozess gestartet werden. Vor jedem neuen Bioreaktor musste der Druck angepasst werden, da sich die Struktur der Biotinte durch die umgebende Temperatur veränderte. Nach Vollendung des Druckvorgangs, wurden die Reaktoren erneut verschlossen und bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank gelagert, um zu verhindern, dass die Biotinte zerlief. Die Weiterverarbeitung war je nach gewünschtem Experiment unterschiedlich und wird in Kapitel 3.7 weiter erläutert.

3.7 Gewebemodelle

Finales Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung komplexer Gewebemodelle. Die unterschiedlichen Gewebearten wurden dabei von den 3D-biogedruckten Blutgefäßen umschlossen. Ein wichtiger Aspekt, die Vaskularisierung, wird in Kapitel 3.7.1 beschrieben. Diese diente ebenfalls für das Gewebemodell der Leber (Kapitel 3.7.2). Eine wichtige Anwendung des *In-vitro*-Modelles ist die Erforschung der metastatischen Kaskade von Tumoren. Daher wurde zunächst ein Tumor-Modell in enger Zusammenarbeit mit dem ExMI weiterentwickelt (Kapitel 3.7.3) Nach Abschluss der Anfertigungen der komplexen Modelle innerhalb der Bioreaktoren konnten diese in den Kreislauf zur dynamischen Kultivierung mit dem Mediumreservoir und der peristaltischen Pumpe eingebunden werden (Abbildung 11).

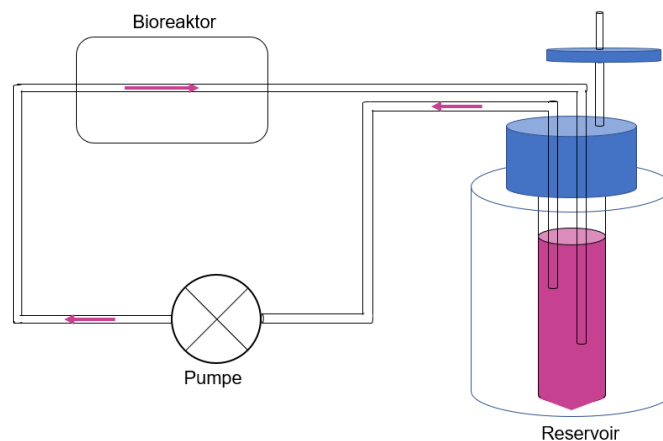


Abbildung 11: Schematischer Aufbau der dynamischen Kultivierung. Dazu wurde der Bioreaktor über Silikonschläuche mit der Pumpe und dem Mediumreservoir in einem Kreislauf eingebunden.

3.7.1 Vaskularisierung

Ein großes Ziel von 3D *In-vitro*-Modellen ist es, selbstorganisierte Mikrokanäle zu erhalten, indem sich Endothelzellen so anordnen, dass sie durchströmbare Hohlstrukturen ausbilden, welche von den großen gedruckten Blutgefäßen abgehen und mit der Umgebung interagieren. Um dies für die weiteren Gewebemodelle zu erreichen, wurden zunächst unterschiedliche statische Versuche in Wellplatten durchgeführt. Diese dienten dazu, unterschiedliche Hydrogele, Zellkompositionen (Zellarten und Verhältnisse zueinander) und Medien miteinander zu vergleichen. Für die Vaskularisierungsversuche wurden GFP-HUVECs alleine sowie in der Ko-Kultur mit Fibroblasten in den Verhältnissen 5:1 und 2:1 in den Hydrogelen Fibrin (2,5 %), Kollagen, sowie den Kombinationen CF_{low} und CF_{high} kultiviert. Die Gesamtzellzahl wurde dabei einheitlich auf drei Millionen Zellen/mL gehalten. 250 μ L der Hydrogel-Zell-Suspensionen wurden dafür in 48er-Wellplatten gefüllt und bei Raumtemperatur unter der Lamina für 30 Minuten zum Gelieren stehen gelassen. Im Anschluss wurden 250 μ L

des entsprechenden Mediums ebenfalls in die Wells gegeben. Dabei wurde entweder reines Endothelmedium (EGM-2) oder ein Mix aus Endothelmedium und Hepatozyten Medium (RPMI 1640) im Verhältnis 1:1 verwendet, da diese Experimente ebenfalls als Vorversuche für das eigentliche Gewebemodell, die Leber, dienen sollten und später in die Tri-Kultur überführt werden sollten. Da die Fibroblasten wenig anfällig sind und nur zur Unterstützung der Hauptzellen (HUVECs und Hepatozyten) dienen, wurden die Experimente mit den Medien der Hauptzellen durchgeführt. Dabei wurden jedoch immer auch Kontrollen angefertigt, in denen die Auswirkung der Medien auf die Fibroblasten getestet wurde. Die Proben wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ für 14 Tage kultiviert. Dabei wurden alle zwei bis 3 Tage die Medien gewechselt, im -80 °C Gefrierschrank gesammelt und die Proben zu den Untersuchenden Zeitpunkten mit PFA fixiert und für die weitere Analyse wie in Kapitel 3.4.5 beschrieben für die Immunfluoreszenzmikroskopie vorbereitet und im Anschluss ausgewertet.

3.7.2 Lebermodell

Zur Erstellung des Lebermodells wurden ebenfalls zunächst zweidimensionale und dreidimensionale statische Versuche durchgeführt. Dazu wurden zunächst Hepatozyten alleine und in Ko-Kultur mit HUVECs in Wellplatten ausgesät, um die richtige Zellkomposition und ein passendes Medium zu ermitteln. Aufgrund der höheren Sensibilität der HUVECs, wurde vor allem der Einfluss der unterschiedlichen Medien zunächst an ihnen getestet. Im Anschluss wurden Ko-Kulturen von HepG2:HUVECs im Verhältnis 1:1, 2:1, 3:1 und 1:2 ausgesät und mit den unterschiedlichen Medien genährt. Um die metabolische Aktivität zu ermitteln, wurden *Cell-Titer-Blue* Viabilitätstests durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.4). Ebenfalls wurden die Proben fixiert und entweder in der Mono-Kultur mit DAPI und Actin-Phalloidin eingefärbt oder in der Ko-Kultur zusätzlich mit VE-Cadherin. Darauf basierend wurden statische 3D-Versuche in unterschiedlichen Hydrogelen (CF_{low} und CF_{high}) in der Ko-Kultur und in der Tri-Kultur mit Fibroblasten angefertigt. Dabei wurde ein Verhältnis von 5:1 und 2:1, Hepatozyten zu entweder HUVECs oder Fibroblasten, sowie Verhältnisse von 6:2:1 oder 4:2:1 von Hepatozyten zu HUVECS zu Fibroblasten verwendet. Im Anschluss wurden die Medien EGM-2 alleine oder der 1:1 Mix von EGM-2 zu RPMI für die Kultivierung verwendet. Das Medium wurde alle 2–3 Tage gewechselt und im -80 °C Gefrierschrank gelagert, um im späteren Verlauf die Produktion von VEGF durch qPCR zu messen. Es wurden CCK-8 Versuche durchgeführt, die Albumin Produktion im Medium gemessen und die Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert, mit unterschiedlichen spezifischen Makern eingefärbt und unter dem Mikroskop analysiert.

Ebenfalls wurden Hepatozyten alleine analysiert, um zu ermitteln, ob es möglich ist, eine sehr hohe Zellanzahl pro mL Hydrogel über einen längeren Zeitraum zu kultivieren. Dazu wurden sechs und acht Mio. Zellen/ mL in den Hydrogelen angemischt und in eine Wellplatte überführt. Durch die hohe Zellanzahl musste das Medium mindestens alle 24 Stunden gewechselt werden.

Die Ergebnisse der statischen Versuche, wurde dann in die dynamische Kultivierung überführt. Dazu wurden die Bioreaktoren, sowie das 3D-Drucken der Gefäßstrukturen wie zuvor beschrieben durchgeführt. In die Zwischenräume der Gelatine-Stränge wurden dann die Hydrogel-Zell-Suspensionen pipettiert. Daraufhin wurden die Reaktoren für 30 Minuten verschlossen unter der Lamina bei Raumtemperatur belassen, um das Gelieren zu ermöglichen. Im Anschluss wurde dann Hydrogel, ohne Zellen, in die Reaktoren gegeben, bis diese vollständig befüllt waren. Erneut wurden die Bioreaktoren bei Raumtemperatur für 30 bis 60 Minuten unter der Lamina gelagert, um erneut das vollständige Gelieren der Hydrogele zu gewährleisten. Dann wurden die Reaktoren um 180 ° gedreht in den Inkubator bei 37 °C gestellt, damit die Gelatine sich verflüssigen kann und die darin enthaltenen GFP-HUVECs durch die Schwerkraft an die Hydrogel Grenzschicht sinken konnten, um dort anzuhaften. Nach

zwei bis vier Stunden, wurden die Bioreaktoren unter die Lamina überführt, um dort mit vorgewärmtem Medium die restliche Gelatine auszuspülen, wodurch Hohlstrukturen entstanden. Die Reaktoren konnten daraufhin mit *Luer-Lock*-Schlauch-Adaptoren versehen werden und an den Kreislauf mit Reservoir und Pumpe angeschlossen werden. Für die dynamische Kultivierung wurde ein Durchfluss von 0,05-0,1 mL/min eingestellt. Die Proben wurden bis zu 21 Tage dynamisch kultiviert. Alle drei Tage wurde die Hälfte des Mediums im Reservoir gewechselt, um für ausreichenden Austausch von Nähr- und Abfallprodukten zu sorgen, aber gleichzeitig wichtige Faktoren, die von den Zellen ausgeschüttet wurden nicht zu stark zu verdünnen oder vollständig zu entfernen. Die Proben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Mikroskop festgehalten. Dies war möglich, indem die Hepatozyten zuvor mit Vybrant rot markiert wurden. Im Anschluss an die Kultivierung wurden die Proben fixiert und erneut unter dem Mikroskop analysiert.

3.7.3 Tumormodell

Die Erstellung der Tumormodelle erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Frau Federica De Lorenzi vom ExMI. Dazu wurden die zuvor gedruckten Strukturen in den Bioreaktoren (Abbildung 12A) mit Kühlpacks in Styroporboxen verpackt und zum Labor des Instituts ExMI gebracht. Dort wurden die Tumorsphäroide, die im ExMI Institut erstellt wurden, aus Kapitel 3.4.2, in die Zwischenräume der Blutgefäße eingebracht, indem diese in Kollagen-Fibrin Hydrogelen resuspendiert mit der Pipette aufgenommen und platziert wurden (Abbildung 12B). Dieser Schritt wurde von Federica De Lorenzi durchgeführt. Je nach Experiment, enthielt das Hydrogel Fibroblasten (mit blauen Fluoreszenzmarkern getaggt) und/oder GFP-HUVECs in einer Konzentration von 10 Millionen Zellen/mL. Diese wurden ebenfalls im ExMI kultiviert und zur Verfügung gestellt. Wie bereits erwähnt, wurde in diesem Projekt in der Zusammenarbeit Abwandlungen der zuvor beschriebenen Komposition der Kollagen-Fibrin Kombinationen verwendet. Im Laufe der Experimente zeigte sich, dass eine zu reichhaltige Matrix zu einem zu steifen Ergebnis führte, wodurch die Endothelzellen sich nicht zu Mikrogefäßen anordnen konnten. Ebenfalls zeigte sich, dass die Zugabe von gewissen Stabilisatoren (wie z.B. Aprotinin, im Anschluss bei der Zusammensetzung beschrieben) auf ein Maß reguliert werden musste, sodass die Matrix zwar stabil genug für eine lange dynamische Kultivierung war, jedoch noch von den enthaltenen Zellen zum Teil degradiert werden konnte, um sich zu organisieren oder um sich in dem Hydrogel noch bewegen zu können. Daher kam es zu einer endgültigen Zusammensetzung der Kollagen-Fibrin-Matrix für die Erstellung der Tumormodelle wie in Tabelle 3 gezeigt, dabei wurden alle Komponenten mit Dulbecco's PBS (DPBS) (1× Dulbecco's PBS ohne Calcium (Ca²⁺) und Magnesium (Mg⁻), Gibco, Life technologies) hergestellt oder damit verdünnt.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Komponenten, deren Konzentration in der Stammlösung, sowie die Endkonzentration im Kollagen-Fibrin-Gemisch.

Material	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration im Kollagen-Fibrin-Gemisch
Kollagen G <i>Biochrom Merck, Berlin, oder Matrix BioScience, Mörlenbach</i>	4 mg/mL	1,8 mg/mL
Thrombin <i>Sigma-Aldrich, Darmstadt</i>	100 U/mL	1 U/mL
Fibrinogen <i>Sigma-Aldrich, Darmstadt</i>	50 mg/mL	20 mg/mL
Calciumchlorid (CaCl₂)	2 M	2,5 mM
Transglutaminase <i>Moo Glue RM Transglutaminase, US</i>	60 mg/mL	6 mg/mL
Aprotinin <i>Abcam, Cambridge, UK</i>	130 KUI/mL	1 U/mL
AA <i>Sigma-Aldrich, Darmstadt</i>		1 %

Der Aufbau wurde für ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur belassen, damit das Hydrogel sich etwas verfestigen konnte. Dies war notwendig, um zu verhindern das beim vollständigen Befüllen die Tumorsphäroide ausgespült wurden. Nach den 15 Minuten, wurden die Bioreaktoren vollständig mit dem Kollagen-Fibrin-Mix befüllt. Erneut wurde der Aufbau, diesmal für 30 Minuten, bei Raumtemperatur unter der Laminar belassen, um eine vollständige Gelierung des Hydrogels zu gewährleisten. Dann wurden die Bioreaktoren erneut verschlossen und unter mehrfachem Rotieren der Reaktoren entlang der Längsachse im Inkubator bei 37 °C für 4 Stunden inkubiert. Bei diesem Schritt verflüssigte sich die Biotinte und die HUVECs lagerten sich durch die Gravitation und Rotation an der ECM-Hydrogel-Grenzschicht an. Nach vier Stunden, konnte das restliche Material mit vorgewärmtem Medium aus den Kanälen rausgespült werden und es blieben die Hohlstrukturen der Gefäße mit ausgekleideter GFP-HUVECs Wand übrig (Abbildung 12C). Die Nadeln des Bioreaktors wurden im Anschluss durch *Luer-Lock*-Schlauch-Adapter über Silikonschläuche mit dem Mediumreservoir und der peristaltischen Pumpe Verbunden und dynamisch kultiviert. Aufgrund der bereits fluoreszierenden Zellen konnten die Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Kultivierung mit dem Fluoreszenzmikroskop bildlich aufgenommen und im Anschluss ausgewertet werden. Dabei stand vor allem die Analyse der angezielten Selbstorganisation von mikrovaskulären Strukturen, sowie das Wachstum der Tumorsphäroide und die Interaktion der Sphäroide mit den umliegenden Zellen im Vordergrund.

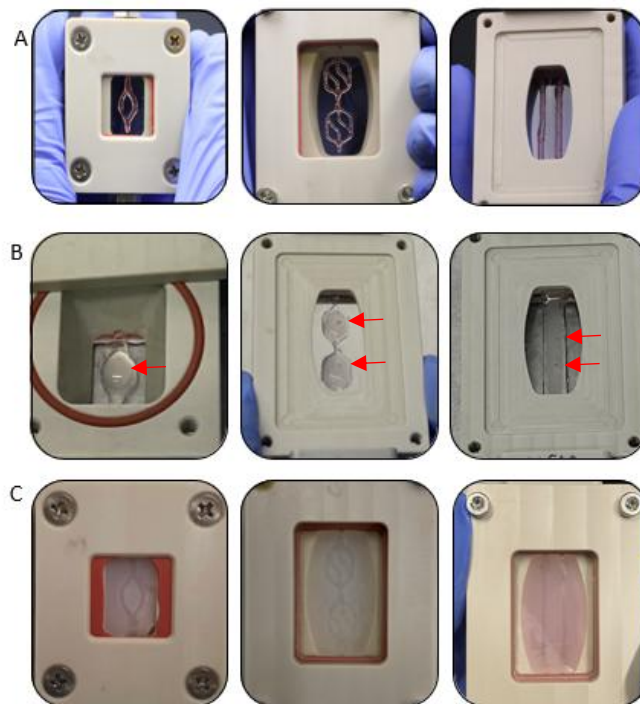


Abbildung 12: Schritt-für-Schritt-Vorgehensweise bei der Erstellung der Tumormodelle in den unterschiedlichen Bioreaktoren. A zeigt die gedruckten Gefäßstrukturen in den Bioreaktoren mit Gelatine. B zeigt die Platzierung der Tumorsphäroide (rote Pfeile) innerhalb der Gefäßstrukturen zusammen mit dem Hydrogel-Zell-Mix. C zeigt die Situation nach der vollständigen Befüllung der Reaktoren, dem Gelieren und dem anschließenden Ausspülen der Gelatine. Die Hohlstrukturen, die zurückblieben sind hier deutlich zu erkennen.

3.8 Herstellung von Mikrokanälen

Ein weiterer Ansatz für die komplexen Modelle war es, nicht nur die großen Blutgefäße bereits in das Modell einzubringen, sondern auch kleinere, bis kleinste, Gefäßstrukturen bereits vorzufertigen. Dazu wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Zum einen die Stempel-Methode, mittels PDMS-Stempel, welche kleine Verbindungen der parallelen Kanäle erzeugt. Und zum anderen die Doppel-Opfermaterial-Methode, welche Pluronic und Gelatine als Materialien nutzt um eine komplexe, sich verzweigende Gefäßstruktur zu erzeugen.

3.8.1 PDMS-Stempel-Methode

Eine weitere Methode, um sehr kleine Kanäle herzustellen, war die mithilfe von PDMS-Stempeln. Dazu wurden entweder erst positive durch den 3D Filament-Drucker (Prusa i3 MK3, PRUSA Research, Prag, Tschechien) hergestellt. Dieser druckte mit Hilfe von zuvor angefertigten Autodesk Inventor Datei PLA (fillamentum, Hulin, Tschechien) Positiv-Formen für die PDMS-Stempel. Diese bestanden aus einem Ramen und einfachen Kanälen. Um noch kleinere Kanäle zu erzeugen, wurden diese mit lithographisch hergestellten Wafern (in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Werkstoffe der Elektrotechnik und durchgeführt durch Danyil Azarkh und Yuan Cao, RWTH Aachen) kombiniert. Die angefertigte Maske und somit das Design der Mikrokanäle ist in Abbildung 13A zu sehen. Dabei war jedes Quadrat 24 x 24 mm groß, jeder innere Radius der Kanäle betrug 2 mm und die Breite der Kanäle betrug von links oben nach rechts unten: 0,033 mm, 0,02 mm, 0,033 mm, bzw. 0,05 mm. An jedem Ende jedes Kanales befanden sich Verbindungspunkte. Die mit dem Filamentdrucker gedruckten Formen wurden auf dem Wafer passend angebracht und durch 40 %iges (w/V) Pluronic

abgedichtet. Anschließend wurde die PDMS-Lösung (Kapitel 3.2.4) in die Formen gegossen und für fünf Minuten in eine Vakuumkammer platziert, um Luftblasen zu entfernen. Danach durften die Stempel für 48 h bei Raumtemperatur vollständig polymerisieren und dann aus den Formen gelöst werden (siehe resultierenden Stempel in Abbildung 13B). Diese wurden dann mit warmem Wasser und anschließend 70 %-igem Ethanol gereinigt. Der fertige Stempel wurde mit einer 4 %-igen Pluronic-Lösung benetzt und um 180 ° gedreht zum Trocknen bei Raumtemperatur gelagert. 5 %-ige Gelatine wurde entweder ohne oder mit $2,5 \cdot 10^6$ HUVECs/mL verwendet. Dazu wurde die Gelatine-Lösung (ohne und mit Zellen) zunächst auf 37 °C erwärmt bzw. verflüssigt. 24 x 24 mm große Deckgläser wurden auf die Stempel gepresst und im Ofen für zehn Minuten bei 45 °C erwärmt. Ebenfalls wurden 100 mL Gefäße (Urinbecher, Sarstedt, Nümbrecht) mit warmem Wasser befüllt und unter der Laminar platziert, um im weiteren Verlauf die Stempel während des Befüllens warm zu halten. Die vorgewärmten Stempel wurden dann auf den warmen Behältern platziert und mit der Gelatine befüllt. Um zu gewährleisten, dass auch die Mikrokanäle befüllt wurden, wurde alles für fünf Minuten im Inkubator bei 37 °C gestellt. Um die Gelatine zu gelieren, wurden die befüllten Stempel in den Kühlschrank bei 4 °C für 30 Minuten gekühlt. In dieser Zeit wurden weitere Behälter mit Eiskaltem Wasser befüllt und ebenfalls im Kühlschrank gekühlt. Nach 30 Minuten wurden die gekühlten Behälter, sowie die befüllten Stempel aus dem Kühlschrank geholt und unter die Laminar gebracht. Durch die Kühlung verflüssigte sich das Pluronic, während die Gelatine stabil blieb. Somit konnten die Stempel vorsichtig von den Deckgläsern gelöst werden. Es blieben Gelatine Kanäle auf den Deckgläsern über, die durch das Lichtmikroskop (Primover, Zeiss, Oberkochen) mit fünffacher und zehnfacher Vergrößerung analysiert werden konnten. Für die weitere Verwendung, wurde Kollagen-Fibrin-Hydrogel wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben angemischt und vorsichtig in zuvor gedruckte Rahmen aus PLA über die Kanäle pipettiert. Die Rahmen wurden zuvor auf den Deckgläsern aufgebracht und mit Pluronic abgedichtet. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Rahmen mit den größeren Kanälen verbunden sind. Um vor Austrocknung zu schützen und um Sterilität zu gewährleisten, wurde alles in Petrischalen durchgeführt und im Anschluss für 30 Minuten für eine vollständige Gelierung bei Raumtemperatur gehalten. Nach 30 Minuten, wurde alles um 180 ° gedreht für vier Stunden in den Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ gestellt. Durch die Erwärmung verflüssigte sich die Gelatine in den Kanälen und die Zellen in der Gelatine konnten aufgrund der Gravitation an die Kollagen-Fibrin-Schicht sinken und dort anhaften. Um die Gelatine anschließend auszuspülen, wurde EGM-2 Medium bei 37 °C erwärmt. Das Konstrukt wurde erneut um 180 ° gedreht und der Rahmen vorsichtig entnommen. Die warme Medium-Lösung wurde dann in die Kanäle gefüllt und somit die Gelatine ausgespült. Für die weitere Kultivierung wurde neues Medium in die Petrischale gefüllt, sodass die Kanäle vollständig mit diesem gefüllt waren. *Hoechst*-Färbung wurde am nächsten Tag dazu verwendet, die Verteilung und Anhaftung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskops zu visualisieren und mit der Software *ImageJ* auszuwerten. Die Versuche wurden unter meiner Aufsicht von meinem Studenten Dominik Andre am ZWBF im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt.

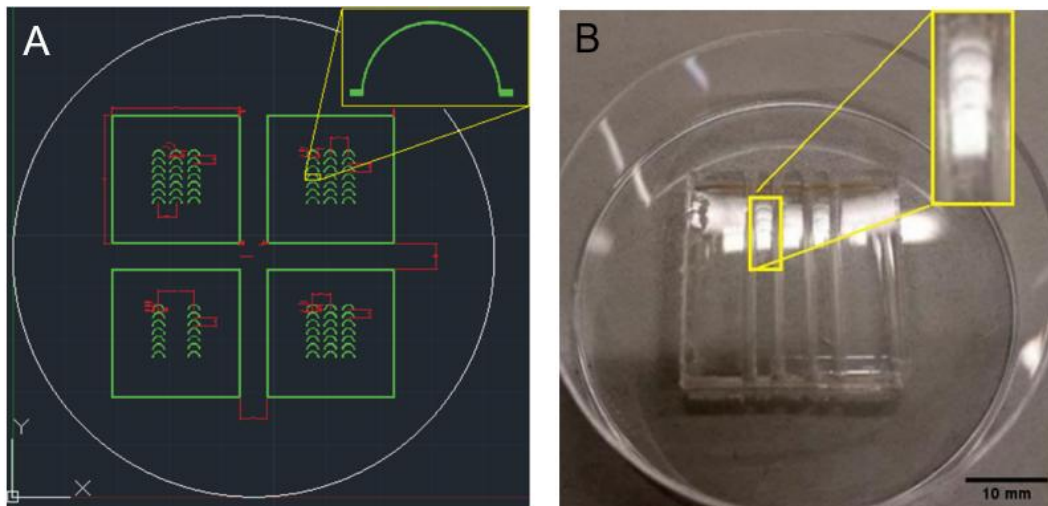


Abbildung 13: A zeigt die Planung des Wafers für die Mikrostrukturen. B zeigt das Bild des resultierenden PDMS-Stempels, mit größeren Kanälen, die durch kleinste Kanäle verbunden sind.

3.8.2 Doppel-Opfermaterial-Methode

Um die *In-vivo*-Situation am besten nachzuahmen, ist es notwendig Gefäßstrukturen in unterschiedlichen Maßstäben und auch deren Verjüngung von größeren zu kleineren Gefäßen abzubilden. Um dies zu ermöglichen, wurde die Doppel-Opfermaterial-Methode mit Hinblick auf deren Eignung der Herstellung und auch Besiedlung mit HUVECs statisch und dynamisch getestet. Dazu wurden zunächst als erste Formgebung *Pluronic*-Stränge parallel gedruckt. Im Anschluss wurde Gelatine in die Zwischenräume pipettiert. Durch Kühlen der Struktur, löste sich das *Pluronic* und ein kleinster Gelatine Strang blieb übrig (siehe Abbildung 14).

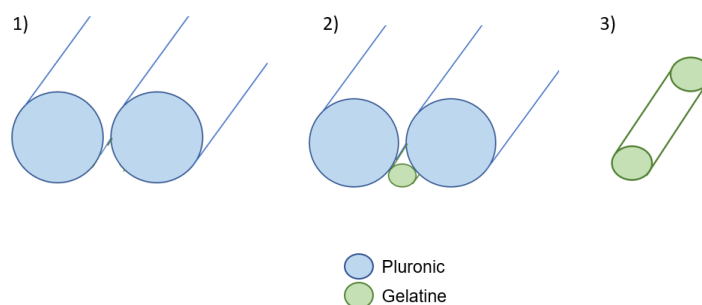


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Doppel-Opfermaterial-Methode. 1) Das Verdrucken zweier parallel verlaufender Pluronic-Stränge. 2) Das Füllen des Zwischenraumes mit Gelatine. 3) Nach dem Herauslösen des Pluronic bleibt ein schmaler Gelatine Strang zurück.

Im Detail wurde zunächst wie in Kapitel 3.1 beschrieben, 35 %-iges *Pluronic* hergestellt. Dieses diente als erste Formgebung und konnte mit dem 3D-Extrusionsdrucker wie folgt verdruckt werden. Das zuvor gekühlte *Pluronic* wurde in eine Spritze (BD 10 mL Spritze mit *Luer-lock* Spitze, Becton, Dickinson and Company, Temse, Belgien) befüllt, deren Kolben auf die Hälfte gekürzt wurde. Des Weiteren wurde die Spritze mit einer 27 G (Innendurchmesser 0,2 mm, Nordson EFD, Feldkirchen) konisch zulaufenden Spitze versehen. Vor dem Druckprozess wurde die befüllte Spritze bei Raumtemperatur für 30 Minuten gelagert, damit das *Pluronic* gelieren konnte. Die Druckplattform wurde mit einem Deckglas (24 x 40 mm) (Brand, Sigma

Aldrich, St. Louis, USA), welches sich in einem 3D-gedruckten PLA-Rahmen befand, versehen und der Drucker mit der Spritze beladen. Die konische Spitze wurde manuell an das Deckglas herangeführt, sodass diese das Deckglas knapp nicht berührte. Die Spritze wurde mit 1,5 bar Luftdruck beaufschlagt und die Geschwindigkeit variierte entsprechend des zu druckenden Bereiches. Für das komplexe Design wurde ein sogenannter *Einlass-Part*, bestehend aus zwölf *Pluronic*-Strängen und somit sechs Kanälen, und ein *Auslass-Part*, bestehend aus sechs *Pluronic*-Strängen und somit drei Kanälen, gedruckt. Dabei enthielten beide Abschnitte einen breiteren Kanal, der sich in die jeweils kleineren Kanäle verzweigt (wie in Abbildung 15 zu sehen). Der geringste Abstand der Stränge betrug dabei 450 μm .

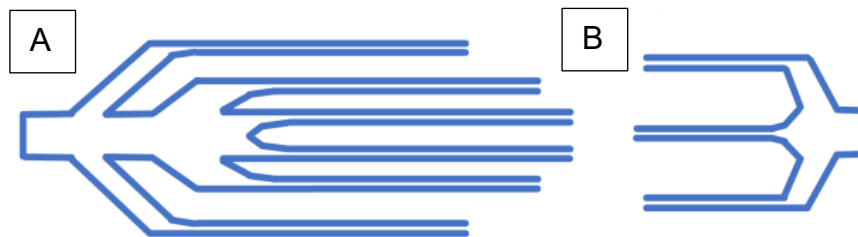


Abbildung 15: Pluronic-Druckmuster. (A) zeigt den *Einlass-Part* mit sechs Abzweigungen. (B) zeigt mit drei Abzweigungen den *Auslass-Part*.

Als zweites Opfermaterial wurde eine 5 %-ige (V/V) Gelatine-Lösung hergestellt. Die genauen Herstellungsparameter (Zeit und Temperatur) wurden dafür zuvor getestet. Die am besten geeignete Gelatine wurde als 10 %-ige (W/V) Gelatine-Stammlösung für 75 °C und 12 Stunden hergestellt und zu gleichen Teilen mit einer Zellsuspension (HUVECs in EGM-2 Medium ohne Heparin) gemischt. Dabei resultierte eine Zellkonzentration von $3 \cdot 10^6$ oder $6 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter. Circa 10 μL pro Mikrokanal wurde von der Gelatine-Zell-Lösung benötigt. Diese wurde vorsichtig durch Pipettieren in die größeren Kanäle in die Struktur eingebracht. Nach vollständiger Gelierung der Gelatine, wurde das Pluronic-Gerüst verflüssigt, indem die Strukturen für fünf Minuten im Kühlschrank bei 4 °C gelagert wurden. Im Anschluss mussten die Gelatine-Strukturen noch mit kaltem PBS gewaschen werden, um jegliche Rückstände des Pluronic zu entfernen. Die zurückgebliebenen Gelatine-Strukturen wurden dann manuell mit einer Pipettenspitze verbunden. Das ECM nachbildende Hydrogel, bestand aus einem Kollagen-Fibrin-Gemisch und wurde wie in Kapitel 3.2.2 angefertigt und dabei in zwei verschiedenen Verhältnissen (Kollagen:Fibrin a) 3:2; b) 1:1) angemischt.

Um nun die Gelatine-Zell-Struktur in das ECM-Hydrogel einzubringen, wurden zwei unterschiedliche Techniken angewandt. Zum einen wurde das Hydrogel vorsichtig auf, bzw. um die Strukturen pipettiert, oder zum anderen wurde zunächst das Hydrogel in den Rahmen pipettiert und das Deckglas mit der Struktur auf die ECM-Hydrogelschicht gelegt. Für die vollständige Gelierung wurde alles bei Raumtemperatur für 30 Minuten gelagert, um dann im Anschluss für 4 Stunden bei 37 °C im Inkubator überkopf zu inkubieren. Dabei verflüssigte sich die Gelatine und die Zellen innerhalb wanderten aufgrund der Gravitation nach unten an die Grenzschicht des ECM-Hydrogels. Dort hafteten diese an und die Gelatine konnte im Anschluss mit 37 °C warmen Medium herausgespült werden.

Für die statische Kultivierung wurden die Konstrukte in eine Petrischale (VWR International, Pennsylvania, USA) überführt und so weit gefüllt, dass die Ein- und Auslässe mit Medium bedeckt waren. Ein kompletter Mediumwechsel wurde alle zwei Tage durchgeführt und die Konstrukte wurden für 1, 3 und 14 Tage im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert.

Für die dynamische Kultivierung wurde das Deckglas mit den Gelatine-Strängen direkt in den Bioreaktor mit einem Ein- und Auslass (wie in Kapitel 3.1) überführt, welcher zuvor mit dem ECM-Hydrogel befüllt wurde. Nach 30 Minuten wurde dieser komplett verschlossen und wie zuvor beschrieben überkopf für vier Stunden im Inkubator bei 37 °C gelagert, um im Anschluss die Gelatine auszuspülen. Danach wurde der Bioreaktor durch Silikonschläuche (Silikonschläuche für die Medizintechnik, Reichelt Chemietechnik, Heidelberg) mit einem Reservoir mit Medium und der peristaltischen Pumpe (Reglo ICC, Darwin Microfluidics, Paris, Frankreich) verbunden. Die dynamische Kultivierung fand innerhalb des Inkubators bei 37 °C für 14 Tage bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,06 mL/min und 0,08 mL/min statt. Alle zwei Tage wurde die Hälfte des Mediums gewechselt, um ausreichend Abfallprodukte der Zellen zu entfernen, jedoch ausreichend Signalmoleküle zu behalten.

Für die Analyse wurden zunächst die Zellkerne der HUVECs mit Hoechst (20 mM, Thermo Fisher, Carlsbad, USA) (1:2000 verdünnt mit PBS) innerhalb der Gelatine-Stränge für 40 Minuten bei Raumtemperatur eingefärbt, um deren Verteilung innerhalb dieser zu analysieren. Des Weiteren wurde eine Lebend/tot-Färbung verwendet, um das Überleben der Zellen nach dem Ausspülen und der anschließenden Kultivierung nachzuweisen. Ebenfalls wurden die Proben im Anschluss an die Kultivierung mit 4 % PFA fixiert und mit Actin-Phalloidin, VE-Cadherin und DAPI gefärbt und im Anschluss mikroskopiert. Die Versuche wurden unter meiner Aufsicht von meiner Studentin Natalija Stojanovic am ZWBF im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Hydrogel Eigenschaften

4.1.1 Kompressionsverhalten

In Abbildung 16 werden die E-Module in kPa aus den Kompressionsversuchen als Mittelwert und deren Standardabweichung für die Kompression von 5-10 %, sowie 10-15 % anschaulich miteinander verglichen. Wie zu erwarten, hatte 2,5%-iges Fibrin Hydrogel mit 27,60 kPa den höchsten E-Modul im Vergleich. Mit steigendem Kollagengehalt nahm der E-Modul ab. Im Allgemeinen ist zu sehen, dass die Werte für beide Bereiche (5-10 % und 10-15 %) ähnlich waren und sich nur gering unterschieden. Lediglich für Fibrin war der Wert um 0,1 kPa geringer. Jedoch nahm auch jeweils die Standardabweichung zu. CF_{High} wies trotz dem höchsten Feststoffgehalt nur den zweit größten E-Modul auf, welcher nur ca. 50 % des Fibrins besaß. CF_{Low} und Kollagen hingegen wiesen eine starke Abnahme des E-Moduls mit zwischen 4,5 und 5,5 kPa auf und somit nur ca. 20% des Fibrins. Der Wert des reinen Kollagens lag dabei höher als der des CF_{Low}, jedoch besaß dieser auch eine deutlich höhere Standardabweichung. Reines Kollagen besaß die höchste Standardabweichung, was auf die mechanische Eigenschaft des Kollagens und der Testmethode zurückzuführen war. Das Kollagen wies wenig Festigkeit, jedoch eine höhere Viskosität und somit eine höhere Verformbarkeit als Fibrin auf. Bei der Messung kam es daher öfters eher dazu, dass das Kollagen seitlich ausgepresst wurde, während Fibrin-haltige Hydrogele formstabiler waren und deshalb die Kompressionskraft über das gesamte Volumen verteilt wurde, ohne das die Proben aus dem Probenkopf raustraten.

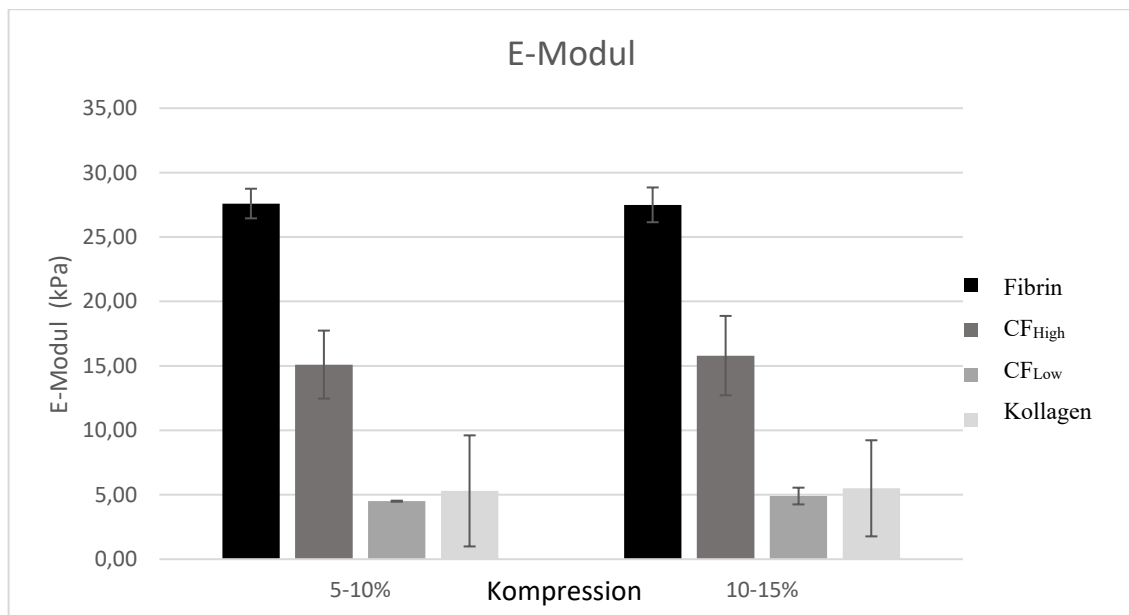


Abbildung 16: Elastizitätsmoduli der Hydrogele aus den Kompressionsversuchen (n=3). Die Mittelwerte und Standardabweichungen finden sich im Anhang Tabelle 4.

4.1.2 Wasserverlust

Der Wasserverlust der komprimierten Proben ist in Abbildung 17 prozentual zum Verlust des Anfangsgewichtes dargestellt. Kollagen wies mit der geringsten Festigkeit den größten Wasserverlust von 68 % auf. Dieser Wert war ähnlich wie der des CF_{low}, das ebenfalls eine geringe Festigkeit aufwies und einen Wasserverlust von 65 %. Erstaunlich ist, dass CF_{High} mit knapp 52 % Verlust so nah an den instabilen Hydrogelen lag und weit entfernt vom Fibrin. Jedoch war hierbei die Standardabweichung deutlich höher als die der anderen Hydrogele. Fibrin wies mit nicht einmal 10 % einen sehr geringen Verlust an Wasser auf.

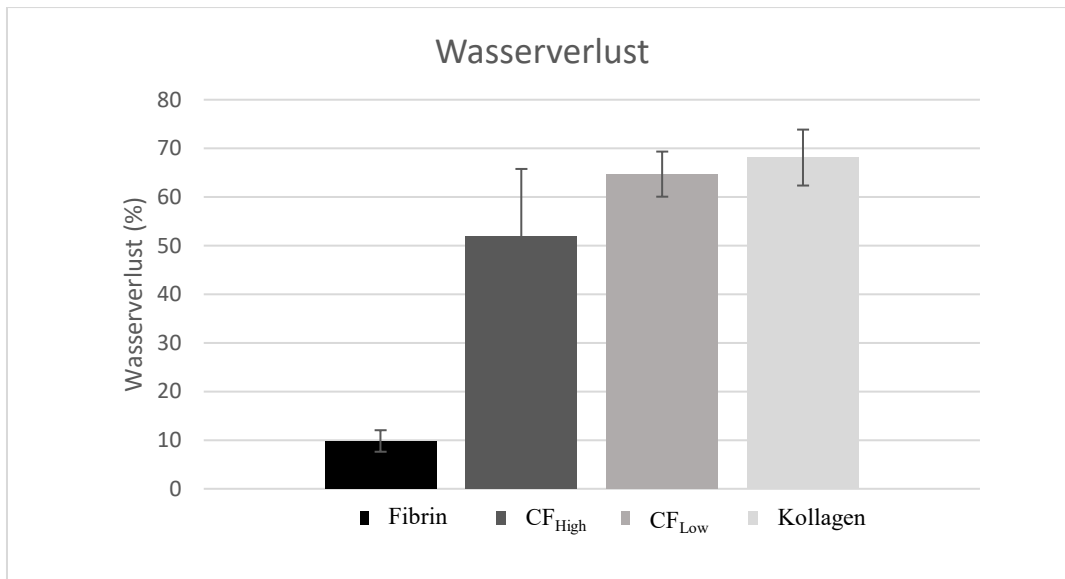


Abbildung 17: Prozentualer Wasserverlust der Proben aus dem Kompressionsversuch sowie deren Fehlerbalken, die der Standardabweichung entsprechen (n=3).

4.1.3 Kontaktwinkel

In den unten gezeigten Fotos (Abbildung 18) sind die jeweiligen Tropfen für entweder Gelatine oder 2,5 %-ige Fibrin auf den unterschiedlichen Oberflächen zu sehen. Für beide Materialien zeigten die Beschichtungen mit Kollagen und Poly-L-Lysin, dass die Tropfen ihre Form verloren, wodurch der Kontaktwinkel sehr gering war. Das PEEK Material wies im Vergleich dazu einen höheren Kontaktwinkel für beide Tropfenmaterialien auf. Durch die Zugabe von Fibrin-haltigen Hydrogelen nahm der Kontaktwinkel in einem Maß zu, sodass eine klarere Abgrenzung der Materialien und somit eine besser Formgebung der Gelatine entstand. Im Allgemeinen zeigte Fibrin als Tropfenmaterial eine geringere Zunahme des Kontaktwinkels auf den unterschiedlichen Oberflächen im Vergleich zur Gelatine als Tropfenmaterial.

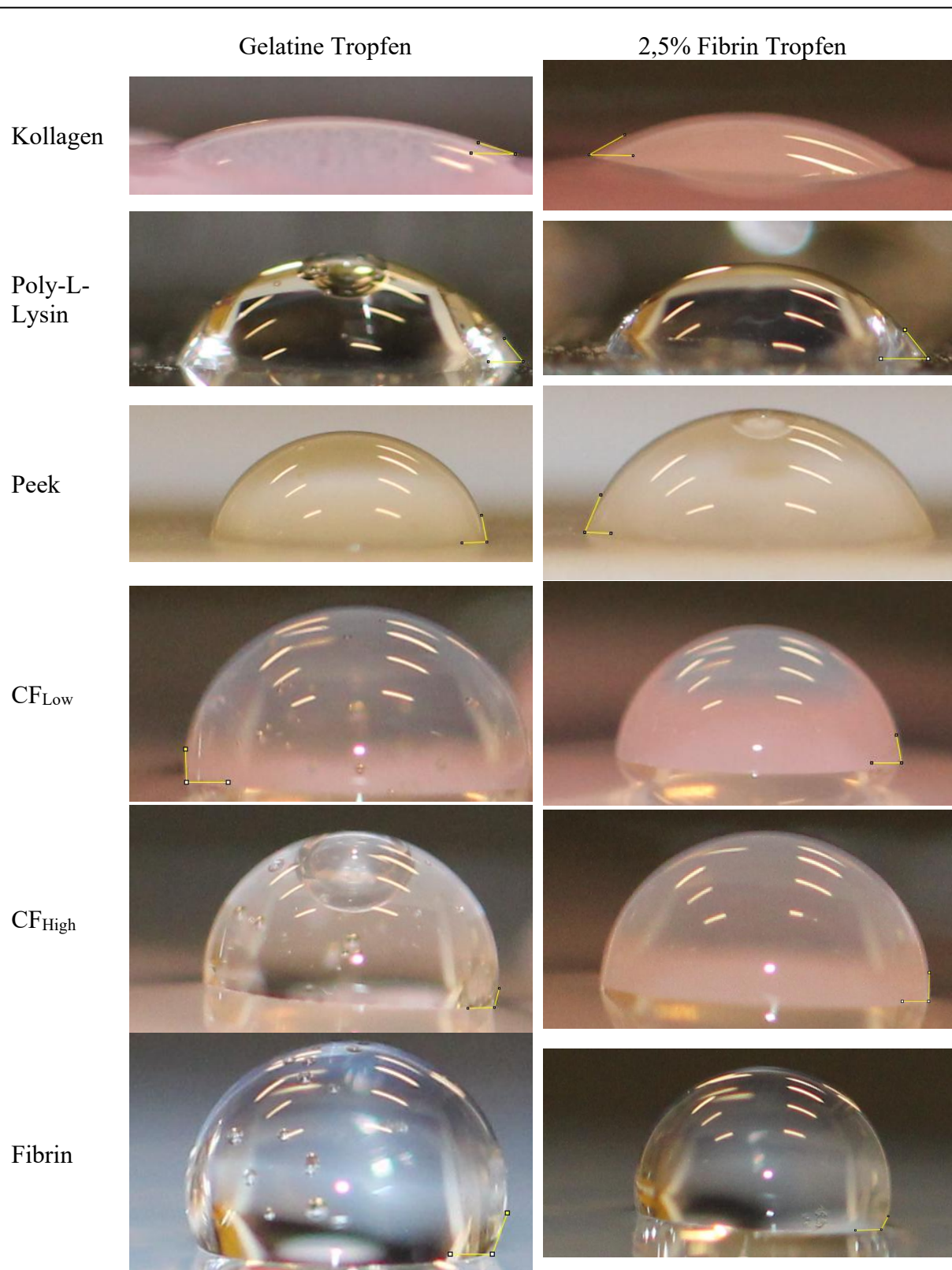


Abbildung 18: Bilder der Gelatine- bzw. Fibrin-Tropfen (Spalten) auf den unterschiedlichen Oberflächen (Zeilen). Diese dienen zur Bestimmung des Kontaktwinkels wie beispielhaft in jedem Bild durch die gelbe Markierung gezeigt wird.

Um die Werte untereinander besser vergleichen zu können, wurden diese mit ihren Standardabweichungen in den nächsten beiden Abbildungen (Abbildung 19 und Abbildung 20) grafisch dargestellt. Zunächst zeigte sich auch hier, dass der Kontaktwinkel zunahm, wenn die Oberfläche mit einem Hydrogel und dabei mit zunehmender Konzentration an Fibrin beschichtet wurde. Dies galt für die Gelatine sowie auch für das Fibrin. Die Beschichtung mit

Poly-L-Lysin hatte auf die Gelatine im Vergleich zu unbeschichtetem Glas kaum einen Einfluss. Für das Fibrin war diese Beschichtung jedoch vergleichbar mit reinem PEEK Material. Für die Gelatine stieg der Kontaktwinkel über 90 Grad bereits für CF_{Low}, während der Winkel für Fibrin noch bei ca. 80 Grad lag. Fibrin wies erst einen erhöhten Kontaktwinkel bei CF_{High} mit knapp 90 Grad auf. Gelatine lag bei dieser Beschichtung bereits weit über den 90 Grad und besaß somit eine gute Formstabilität.

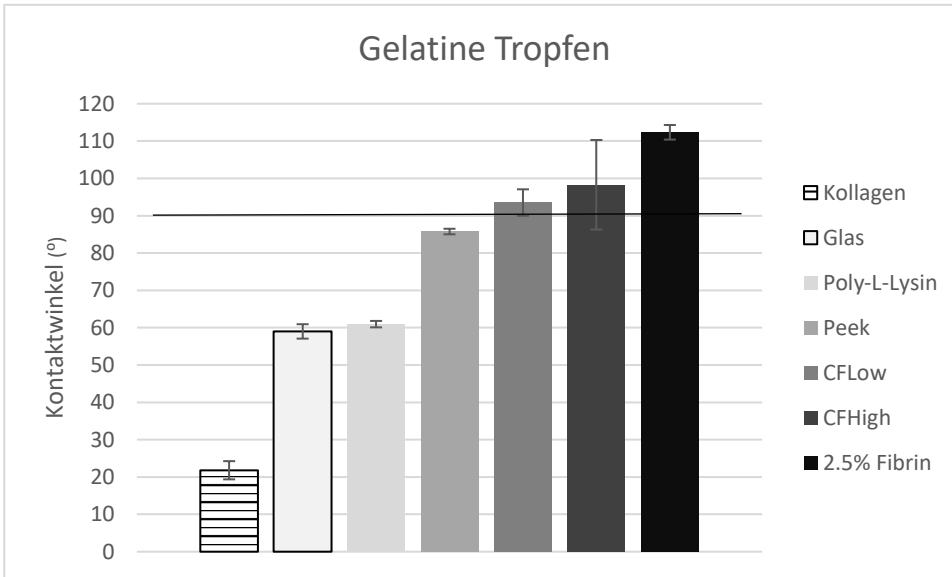


Abbildung 19: Kontaktwinkel des Gelatine Tropfens auf unterschiedlichen Oberflächen.

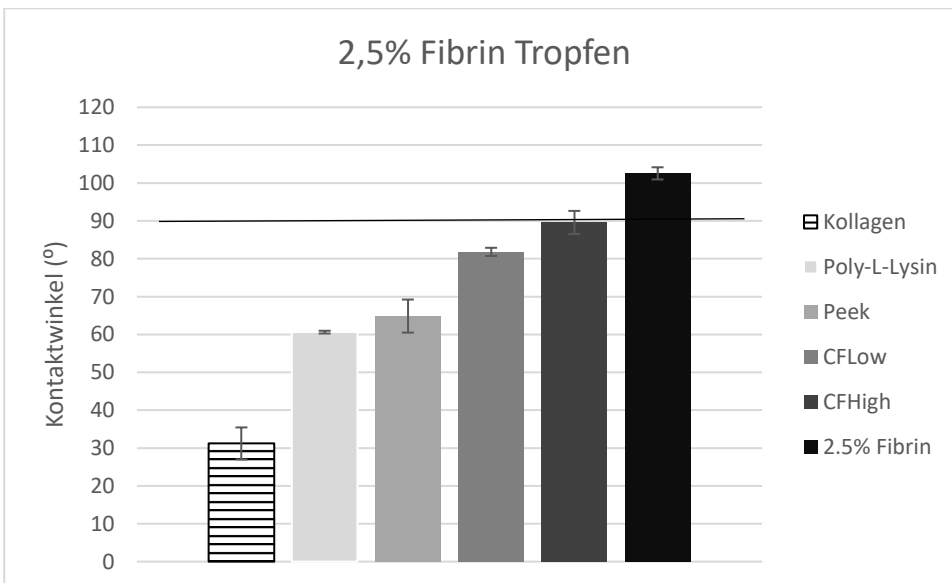


Abbildung 20: Kontaktwinkel des Fibrin Tropfens auf unterschiedlichen Oberflächen.

4.1.4 Morphologie und Porengrößen

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Abbildung 21) wurden von jeder Hydrogel Variante in unterschiedlichen Vergrößerungen aufgenommen. Aus diesen Bildern wurde dann im weiteren Verlauf die Porengröße mittels FIJI Software bestimmt.

Auf den ersten Blick wird deutlich, dass Fibrin die kleinste Porengröße aufwies. Dieses wurde auch in der Messung (Abbildung 22) mit einer durchschnittlichen Porengröße von $0,08 \mu\text{m}$ bestätigt. Diese lag weit unter dem durchschnittlichen Wert von Kollagen mit $1,07 \mu\text{m}$ und war somit mehr als 13-mal kleiner. In der Kombination von Kollagen und Fibrin, zeigte sich eine geringe Porengröße mit zunehmenden Fibrin-Gehalt. Dabei sank der Wert für die Porengröße von Kollagen-Fibrin mit hohem Fibrin-Gehalt (CF_{High}) im Vergleich zu reinem Kollagen auf $0,91 \mu\text{m}$. Die Kombination mit geringerem Fibrin-Anteil (CF_{Low}) wies mit $1,13 \mu\text{m}$ die größte Porengröße auf. Vergleicht man den Feststoffgehalt der Hydrogele, besaß Fibrin mit $2,5 \%$ Feststoffgehalt den geringsten Anteil und müsste somit die geringste Dichte aufzeigen. Obwohl Kollagen einen höheren Feststoffgehalt von $3,8 \%$ enthielt, besaß es eine deutlich größere Porengröße, aufgrund der Struktur der Fasern des Kollagens, welche sich zum Teil verdrillten oder sogar Knotenpunkte aufwiesen. Diese Verdrillungen und Knotenpunkte waren auch in der Kombination mit Fibrin sichtbar. Wobei dabei mehr Abzweigungen der Fasern zu erkennen waren. Des Weiteren wirkten die Fasern schlanker im CF_{Low} Hydrogel und eher vergleichbar mit purem Kollagen. Diese Kombination wies einen Feststoffgehalt von $4,4 \%$ auf und ist damit vergleichbarer mit purem Kollagen. CF_{High} im Gegenteil, wies den höchsten Feststoffgehalt von $9,7 \%$ auf. Dieses Hydrogel müsste somit die höchste Dichte aufweisen, wurde jedoch durch die Strukturierung der Kollagenfasern aufgelockert.

Allgemein verdeutlichen die Bilder, dass durch die spezielle Ausbildung der Kollagenfasern, die Struktur aufgelockert wurden und somit die Poren vergrößert. Die Messungen zeigen, dass ein geringer Anteil an Fibrin diese Poren positiv beeinflusste. Jedoch Fibrin im reinen Zustand oder in zu hoher Konzentration die Porengröße verkleinerte.

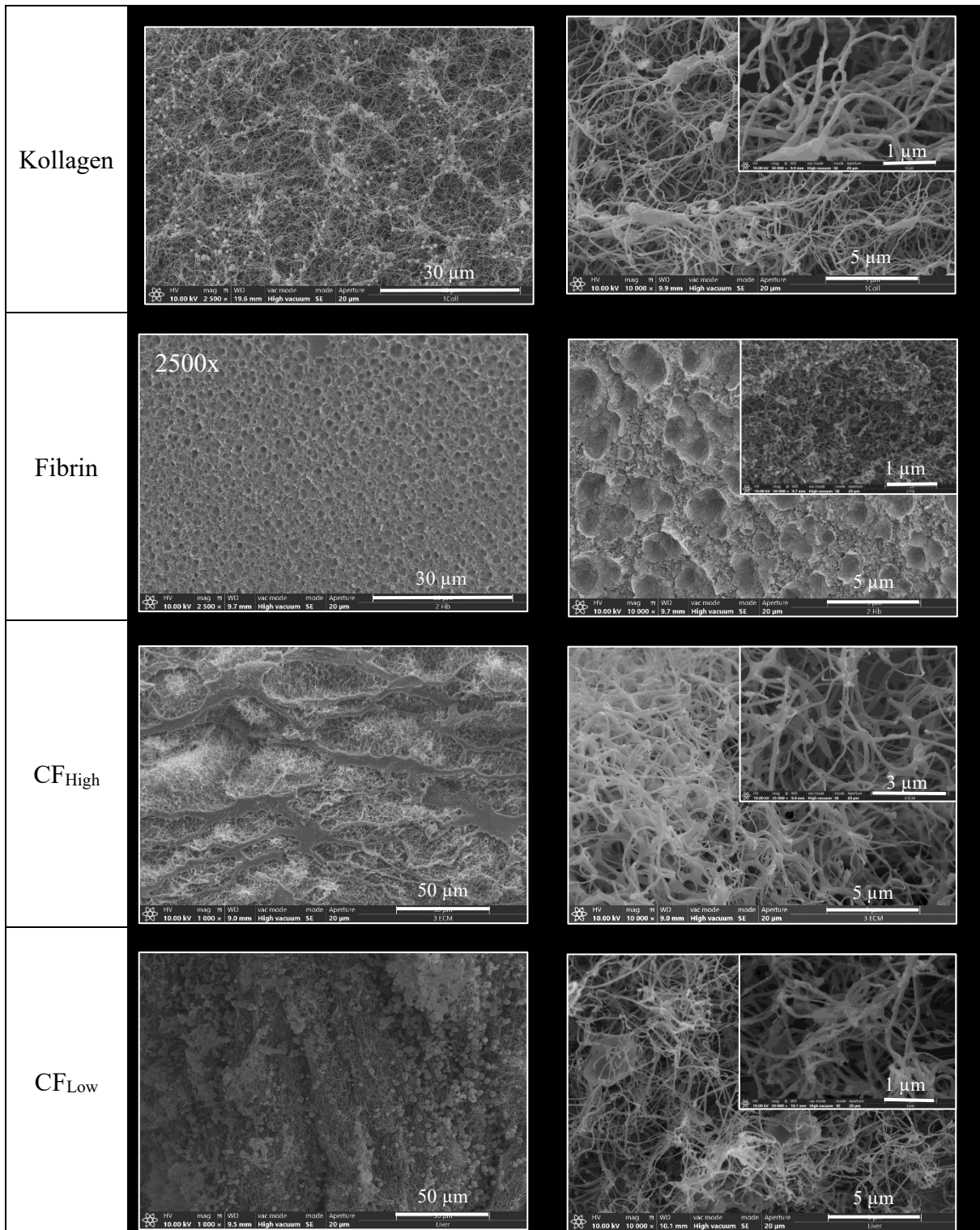


Abbildung 21: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der einzelnen Hydrogele.

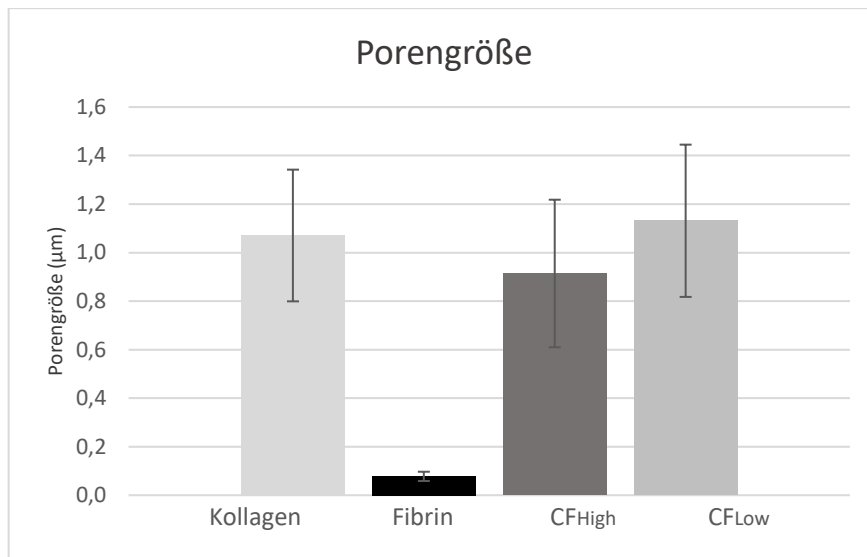


Abbildung 22: Porengrößen der getesteten Hydrogele auf der Basis der Auswertungen aus den REM-Aufnahmen (n=10).

4.2 Endothelbildung

4.2.1 Endothelbildung unter statischer Kultivierung

Betrachtet man Abbildung 23 erkennt man, dass die Bedeckung des Hydrogels vor allem beim Fibrin nahezu lückenlos war. Im Vergleich dazu, erkennt man bei dem Hydrogel CF_{High}, dass manche Bereiche weniger bedeckt waren oder durch Zellen überdeckt wurden, die sich weiter ausbreiteten, um einen Zell-Zell Kontakt herzustellen. Ebenfalls wirkte die Oberfläche dadurch weniger ebenmäßig, was durch kleine Täler im späteren Versuch zu kleinsten Turbulenzen in der Strömung hätte führen können. Vergleicht man Tag eins der beiden Proben, wird deutlich dass die Zellen eine schnellere Anhaftung an das CF_{High} Hydrogel fanden im Vergleich zum Fibrin. Jedoch war die Dichte der Zellen dort auch geringer und die Zellen ausgebreiteter als bei dem Fibrin Hydrogel was die Beobachtung beeinflusst haben könnte. Denn auch bei dem Fibrin hatten die Zellen bereits an Tag eins eine elongierte Form und waren nicht mehr rund. Die Dichte der Zellen wird auch bei der Aufnahme an Tag drei deutlich. Die Zellen auf dem Fibrin erschienen schmaler, jedoch dichter beieinander. Des Weiteren schien Fibrin eine ebenmäßigere Oberfläche zu bieten, da hier die Zellen im Großteil auf einer Fokusebene lagen, während sich bei dem Kollagen-Fibrin Gemisch kleine Berge und Täler abzeichneten. Diese Beobachtung zog sich bis Tag neun durch. Ab Tag sechs waren die Zellen circa gleich groß, unabhängig von dem Hydrogel. Die Zelldichte war vergleichbar. An Tag neun hatte die Zelldichte insgesamt bei beiden Proben abgenommen, wobei ein stärkerer Abfall bei dem CF_{High} festzustellen war. In den Bereichen, die größere Abstände aufwiesen, dehnten sich einzelne Zellen aus, um die Lücken zu überbrücken.

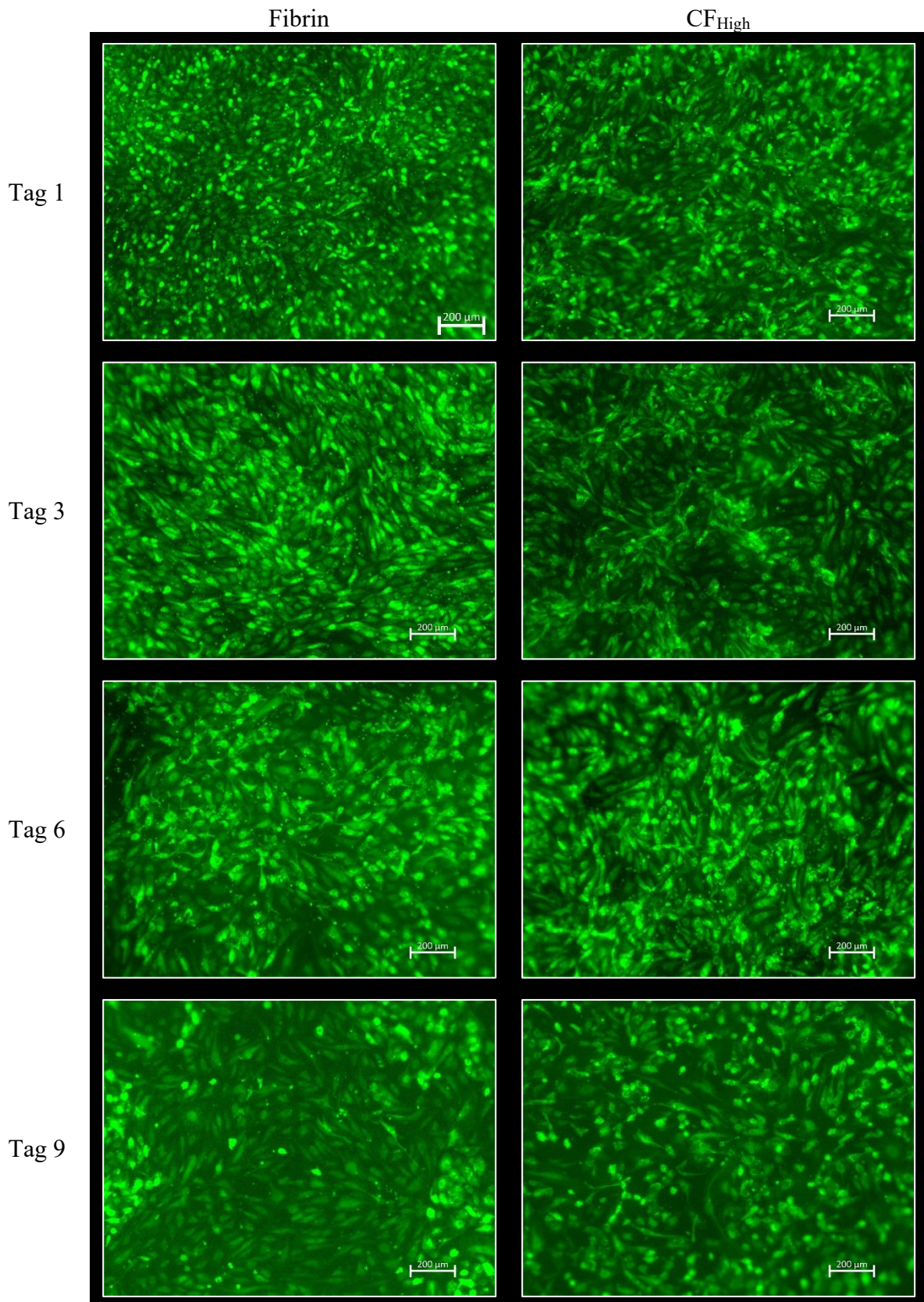


Abbildung 23: Endothelbildung unter statischer Kultivierung. Gezeigt werden GFP-HUVECs auf dem Fibrin Hydrogel oder dem Kollagen-Fibrin Gemisch mit hohem Fibrin Anteil (CF_{High}). Dabei entspricht die Aufnahme den Zeitpunkten Tag 1, Tag 3, Tag 6 und Tag 9. Die Skalenbalken entsprechen 200µm.

Die Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen (Abbildung 24) zeigten zum einen eine Vergrößerung von 250 auf, während Details in einer 2500-fachen Vergrößerung dargestellt werden. Einzige Ausnahme ist dabei die detaillierte Vergrößerung an Tag eins des CF_{High} Hydrogels, hierbei handelt es sich um eine 5000-fache Vergrößerung. Die weißen kugelartigen Kristalle, die auf den Aufnahmen zu erkennen sind, sind Artefakte, die sich bei der kritischen Trocknen aufgrund des verwendeten Buffers bei der Vorbereitung der Proben für die Aufnahmen ausgebildet hatten. Diese werden im weiteren Verlauf nicht berücksichtigt. Die Aufnahmen zeigten, dass sich bereits an Tag eins eine homogene Zellschicht ausgebildet hatte, unabhängig dabei von dem verwendeten Hydrogel. In der detaillierten Vergrößerung erkennt man auch, wie sich einzelne Zellausstülpungen von der Zelle weg über das Hydrogel erstreckten um in Kontakt mit benachbarten Zellen zu treten. Ab Tag drei erkennt man, dass die Abstände zwischen den einzelnen Zellen geringer wurden und diese auch bis Tag neun gering blieben. Und auch in den REM-Aufnahmen erschien die Oberfläche des Fibrins ebenermäßiger. Die Oberfläche des CF_{High} schien sich nach kurzer Zeit zu verziehen, was mit Faltenwürfe auf den Bildern zu vergleichen ist. Dies konnte an dem zusätzlichem Kollagen liegen, das dafür bekannt ist, stärker zu kontrahieren.

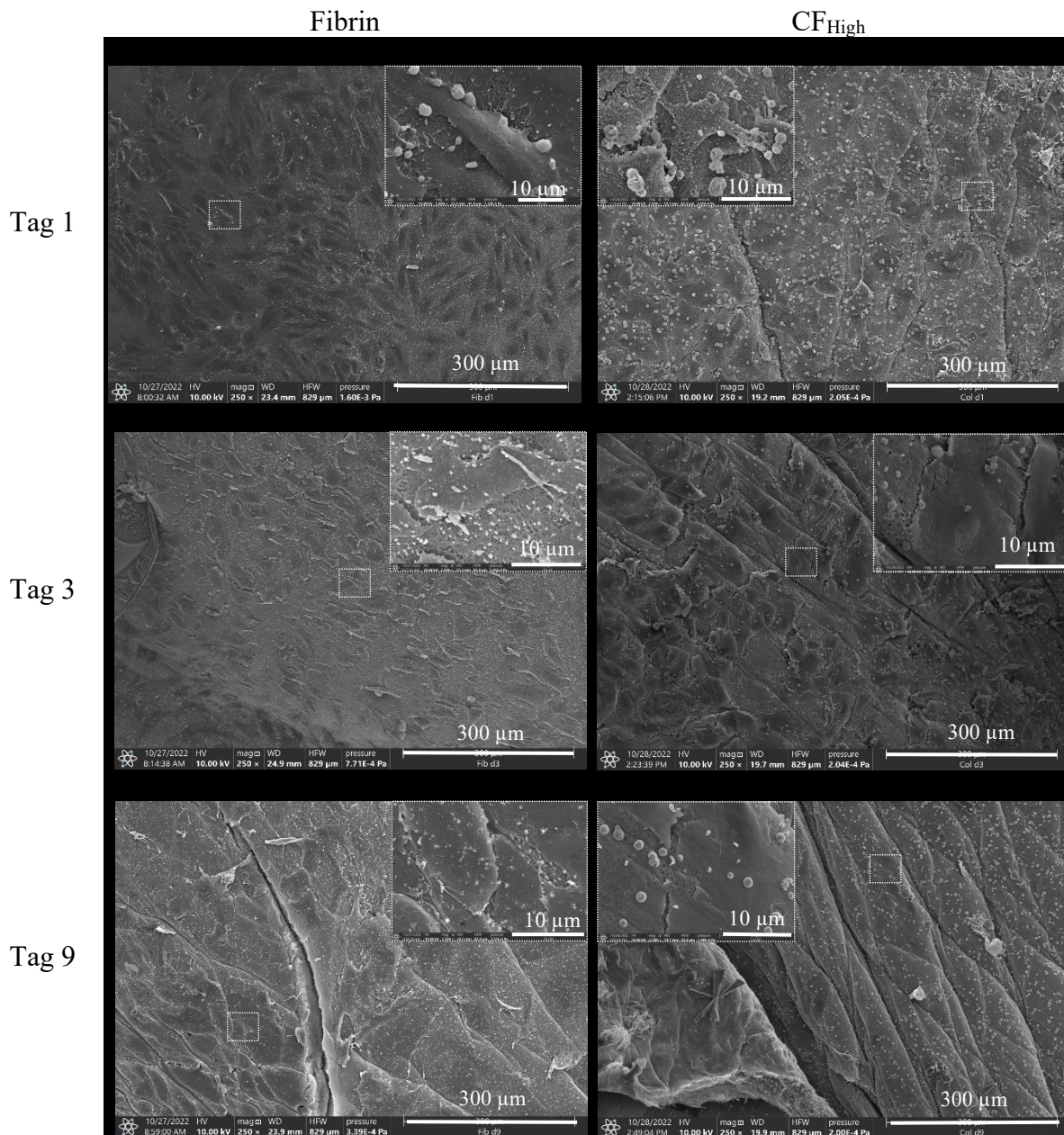


Abbildung 24: Rasterelektronenaufnahme von ausgesäten HUVECs auf entweder Fibrin oder Kollagen-Fibrin Hydrogel (CF_{High}) an Tag 1, Tag 3, Tag 6 und Tag 9. Die Vergrößerungen sind jeweils 250-fach und zudem noch einmal ein detaillierter Ausschnitt mit 2500-facher Vergrößerung. Nur für die CF_{High} Tag 1 Aufnahme wurde eine Vergrößerung von 5000-fach gewählt.

Des Weiteren wurden die Zellen mit VE-Cadherin eingefärbt (Abbildung 25). Ähnlich wie bei den Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen, wurden die Verbindungen benachbarter Zellen bereits ab Tag eins deutlich sichtbar, unabhängig vom Hydrogel. Für beide Hydrogele verstärkte sich die Ausbildung der VE-Cadherin Zell-Zell Verbindungen mit jedem Zeitpunkt. Bereits ab Tag drei war diese Verbindung in beiden Proben stark ausgeprägt. Die Abstände der Zellen wurden ebenfalls mit steigendem Zeitpunkt dichter. Die Ausprägung der Zell-Zell Verbindung im Fibrin waren dabei etwas stärker ausgeprägt, während die Schicht dichter erschien. Vor allem in der Abbildung für Tag drei und Tag neun schienen die Zellen näher beieinander auf dem Fibrin Hydrogel im Vergleich zum CF_{High} Hydrogel und die VE-Cadherin Verbindungen dichter und somit stärker ausgeprägt.

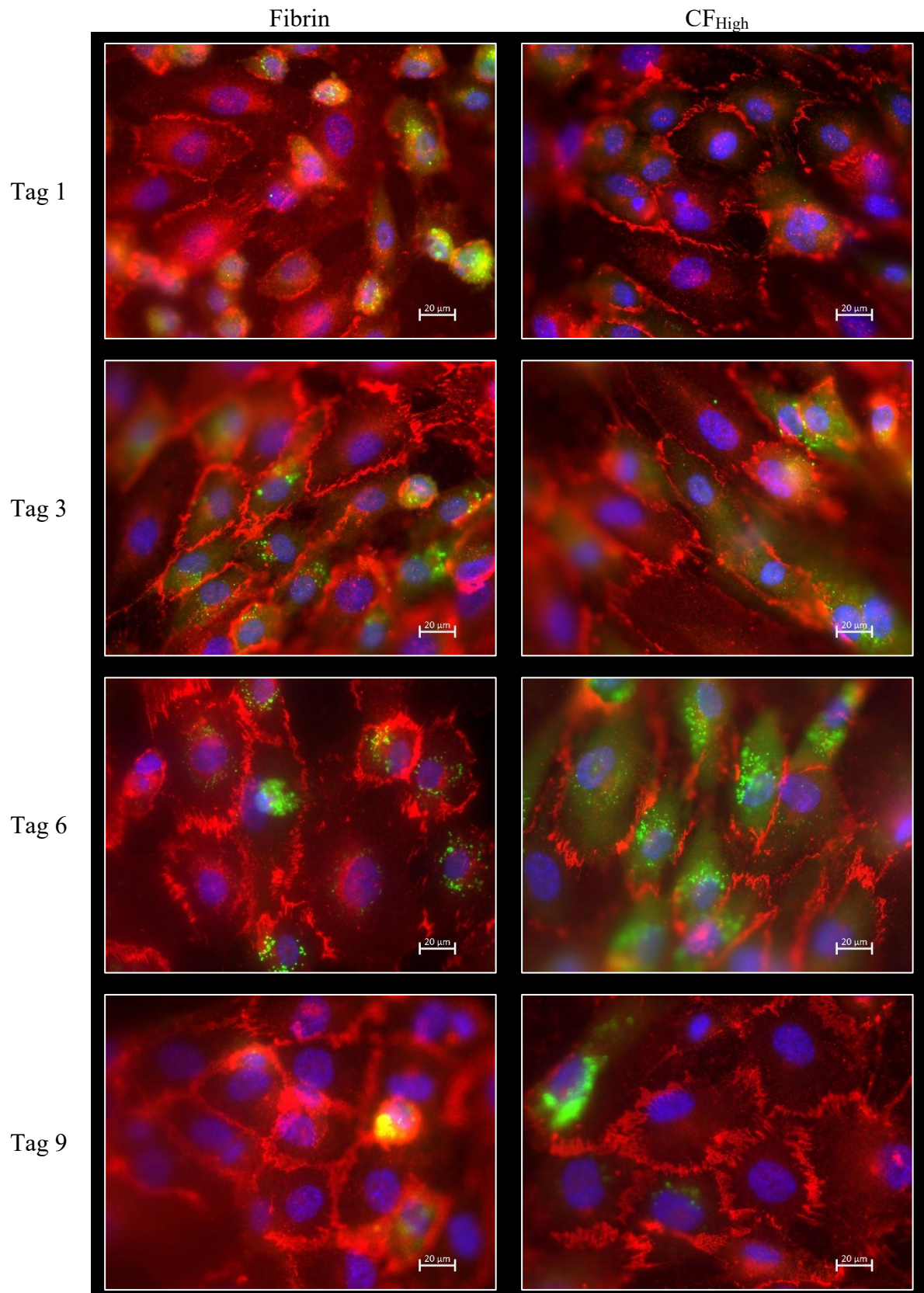


Abbildung 25: VE-Cadherin Färbung (rot) der HUVECs zur Veranschaulichung der Zell-Zell Verbindungen. Blau entspricht der DAPI Färbung für den Zellkern und grün ist das GFP der Zelle. Die Aufnahmen sind für Tag 1, 3, 6 und 9 für Fibrin und CF_{High} Hydrogele aufgenommen wurden. Die Skalenbalken entsprechen 20 μm .

Vergleicht man die Verteilung des Vinculins, lässt sich keine genaue Aussage tätigen (Abbildung 26). Es bildeten sich vereinzelte spezifische Adhäsionspunkte aus, welche als stärkere Anlagerung des Vinculins punktförmig zu erkennen waren. Zwischen den beiden Hydrogelen war weder an Tag eins noch an Tag neun ein Unterschied untereinander festzustellen. Verstärkte Anlagerungen des Vinculins waren vor allem an Tag neun deutlich ausgeprägt als an Tag eins für beide Hydrogele. Vergleicht man die Zellgröße, so wurde deutlich, dass diese sich zwischen Tag eins und Tag neun deutlich vergrößerten, unabhängig vom jeweiligen Hydrogel. Wobei die Zellen sich im kollagenhaltigen Hydrogel weiter ausdehnten.

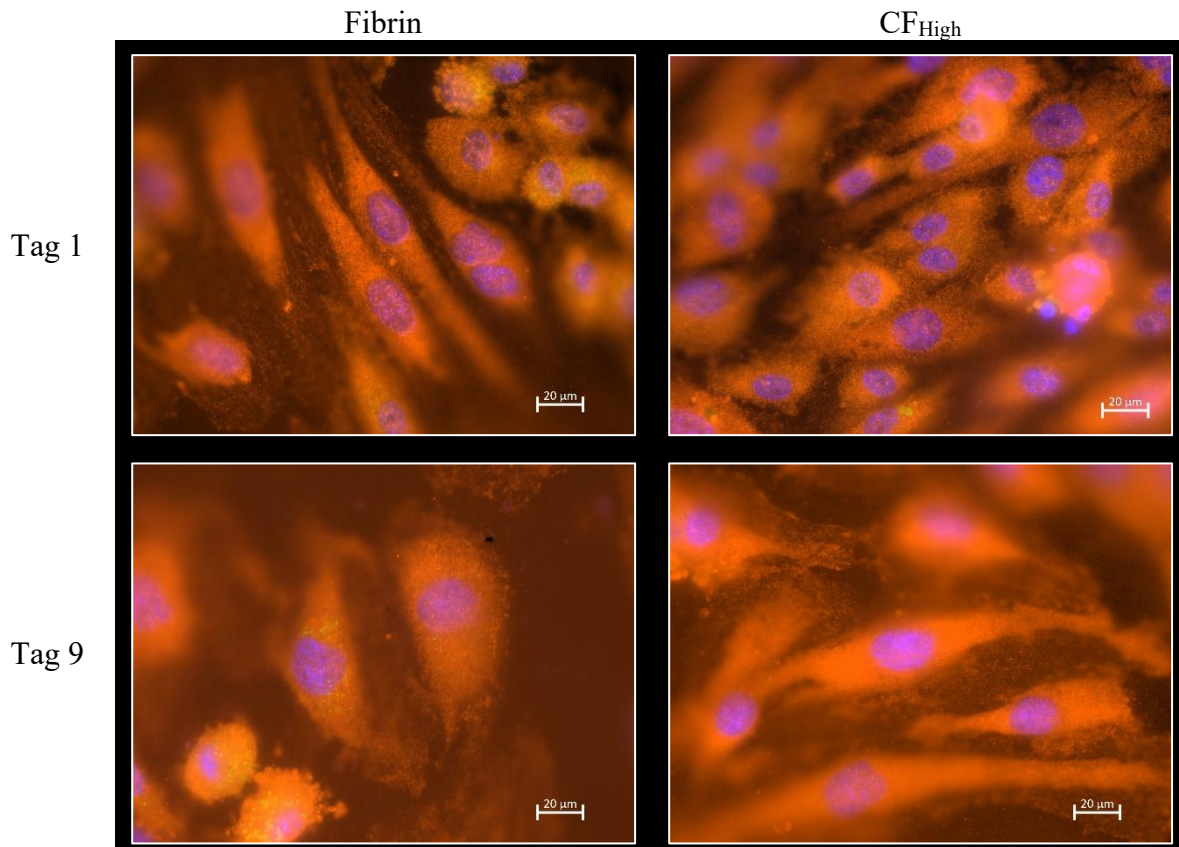


Abbildung 26: Vinculin (orange) und DAPI (blau) Einfärbung der HUVECs an Tag 1 und Tag 9. Skalenbalken entspricht 20 µm.

4.2.2 Endothelbildung unter dynamischer Kultivierung

Im Vorversuch (Abbildung 25) zeigte sich, dass ein Zeitraum von 72 Stunden ausreicht, um eine stabile Zell-Zell Verbindung mittels VE-Cadherin aufzubauen. Für die allgemeine Analyse wurde zunächst der statische Zeitpunkt mit dem Mikroskop aufgenommen, bevor die Pumpe und somit die dynamische Kultivierung gestartet wurde. Diese Aufnahmen sind in der Abbildung 28 als t_0 gekennzeichnet. Im Anschluss wurde entweder nach 3 h, 24 h oder 72 h die dynamische Kultivierung gestartet. Dabei wurde eine schrittweise Erhöhung der Durchflussgeschwindigkeit gewählt. Zunächst wurde 24 Stunden lang ein Durchfluss von 0,4 mL/min gewählt und im Anschluss auf einen Durchfluss von 0,8 mL/min erhöht. Diese Werte entsprachen in etwa der Umrechnung vom Durchmesser der gedruckten Blutgefäße und der Durchmesser der hier gewählten Kammer. Zuvor wurde der Verlauf der Strömung, sowie die entstehenden Scherspannungen mit der Software Ansys simuliert (simuliert von Mert Karpat (ZWBF) auf Grundlage von mir angefertigter CAD-Dateien). Diese sind in Abbildung

27 aufgeführt. Durch die Formgebung der Kammer und der Winkelung des Ein- bzw. Auslasses, wurde vermieden, dass Turbulenzen während der dynamischen Kultivierung entstehen. Dies wurde durch die homogene Verteilung der Strömung in Abbildung 27 deutlich. Die Linien verliefen nebeneinander, ohne dabei Verwirbelungen aufzuweisen. Das Scherspannungsprofil beider Durchflussgeschwindigkeiten (0,4 und 0,8 mL/min) zeigte wie erwartet vor allem im mittleren Abschnitt eine homogene Verteilung dieser. An den Ein- bzw. Auslässen war die Scherspannung am höchsten, da dort das Medium eintritt bzw. beim Austritt durch einen geringeren Querschnitt gepresst wird, wodurch es zuvor zu höheren Beanspruchungen kommt, was auch durch die erhöhte Geschwindigkeit der Strömungslinien verdeutlicht wurde. Die Geschwindigkeiten waren im mittleren Abschnitt für beide Durchflussgeschwindigkeiten sehr homogen. Für die geringere Durchflussgeschwindigkeit von 0,4 mL/min betrug diese maximal 0,002 m/s, während sie zu den Ein- bzw. Auslässen hin einen Spitzenwert von 0,004 m/s innerhalb der Kammer und 0,007 m/s innerhalb der Ein- / Auslässen erreichte. Diese Geschwindigkeiten führten zu Scherbeanspruchungen der HUVECs im mittleren Bereich von bis zu 0,001 Pa und 0,001 Pa bis maximal 0,003 Pa in der Region um den Ein- bzw. Auslass. Für die erhöhte Flussgeschwindigkeit von 0,8 mL/min erhielt man für den mittleren Bereich eine Durchschnittsgeschwindigkeit von ca. 0,002 m/s und in der Region um den Ein- bzw. Auslass Spitzenwerte von 0,008 m/s innerhalb der Kammer und 0,015 innerhalb der Verengungen. Die resultierenden Scherspannungen betragen für den mittleren Abschnitt zwischen 0,001 Pa und 0,002 Pa und für die Region um den Ein- bzw. Auslass Werte zwischen 0,002 Pa bis maximal 0,006 Pa.

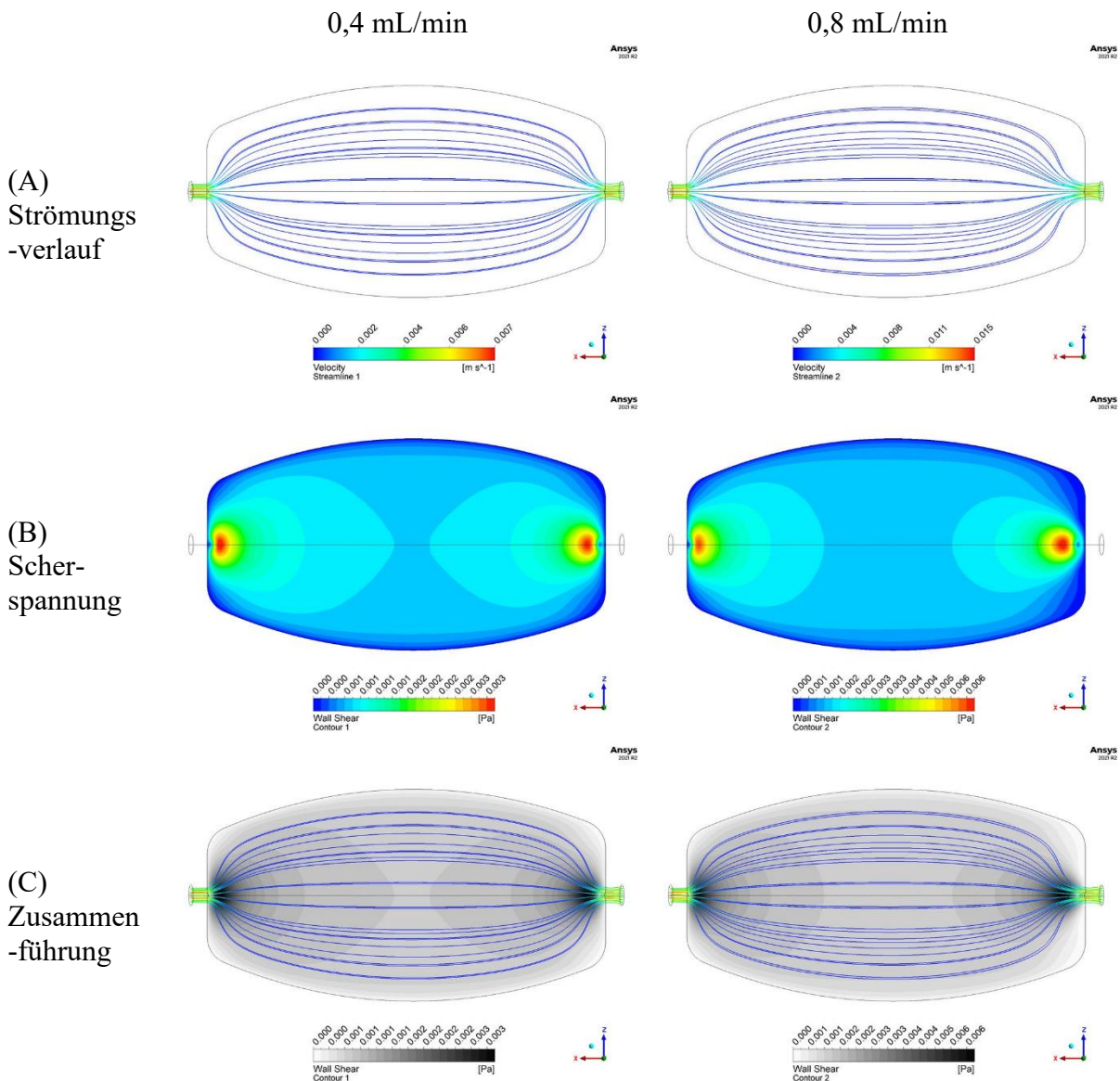


Abbildung 27: ANSYS Simulation der Strömungen in der Bioreaktor Kammer, durchgeführt von Mert Karpat (ZWBF). (A) zeigt den Strömungsverlauf, (B) die Scherspannungen, die auf die HUVECs wirken würden und (C) fügt beides noch einmal zusammen. Die Simulation wurde für eine Durchflussgeschwindigkeit von 0,4 bzw. 0,8 mL/min durchgeführt.

In der nächsten Abbildung (Abbildung 28) sind die Proben zum Zeitpunkt t_0 für drei Stunden, 24 Stunden und 72 Stunden in der ersten Spalte dargestellt. Diese beschreiben den statischen Zustand der Zellen bevor die Pumpe für den Durchfluss gestartet wurde. Diese wurden auf das Hydrogel Fibrin gesät. Es wurde deutlich, dass die Dichte der Zellen mit jedem Zeitpunkt zunahm. Während die Zellen bereits nach drei Stunden die gesamte Oberfläche fast vollständig bedeckten, wies sie nach 24 Stunden keine Lücken mehr auf. Auffallend war die Form der Zellen, die nach drei Stunden noch eine rundliche Form aufwiesen, während sie sich nach 24 Stunden ausstreckten und somit ihre gewohnte Form annahmen. Nach 72 Stunden waren die Zellen weiter ausgebreitet, als nach 24 Stunden, wobei sie weiterhin die gesamte Oberfläche bedeckten. Schaltete man nun den geringen Durchfluss ein, war zu erkennen, dass die Zellen mit drei Stunden weiterhin ihre Runde Form behielten. Es war keine Ausrichtung der Zellen zu erkennen. Während die allgemeine Größe der Zellen zunahm, nahm die Bedeckung der Oberfläche durch die Zellen ab, was dafür sprechen könnte, dass die Zellen sich von der Fibrin Matrix abgelöst hatten und ausgespült wurden. Nach weiteren 24 Stunden mit erhöhter

Durchflussgeschwindigkeit, bedeckten die Zellen die Oberfläche noch weniger und wiesen eine noch geringe Ausdehnung auf. Die Zellen der 24 Stunden Probe, bedeckten nach dem ersten Tag mit 0,4 mL/min Durchfluss die gesamte Oberfläche. Es war kaum eine Ausrichtung der Zellen zu erkennen, jedoch hatte sich die Form der Zellen ein wenig verändert. Sie waren nun weniger ausgestreckt und vereinzelt Zellen wiesen eine runde Form auf. Nach Erhöhung der Durchflussgeschwindigkeit auf 0,8 mL/min bedeckten nur noch wenige Zellen die Oberfläche und die Form der verbleibenden Zellen war klein und rundlich. Das beste Ergebnis für diesen Versuch war durch die Probe mit einer statischen Anhaftungszeit von 72 Stunden zu erkennen. Wie bereits erwähnt, starteten diese Zellen bereits mit einer lückenlosen Bedeckung der Oberfläche, wobei sie bereits weit ausgedehnt waren. Nach 24 Stunden mit geringem Durchfluss wiesen die Zellen eine Ausrichtung auf, während sie sich ebenfalls weiter ausdehnten. Ihre Morphologie war der *in vivo* Situation ähnlich. Und auch nach Erhöhung der Durchflussgeschwindigkeit war keine Verschlechterung des Zustandes zu erkennen. Die Zellen waren weiterhin ausgedehnt, wenn auch enger beieinander und somit schmäler als zuvor. Die gesamte Oberfläche der Fibrin Matrix wurde mit Endothelzellen bedeckt, während sie sich alle in eine Richtung entlang der Strömung ausrichteten.

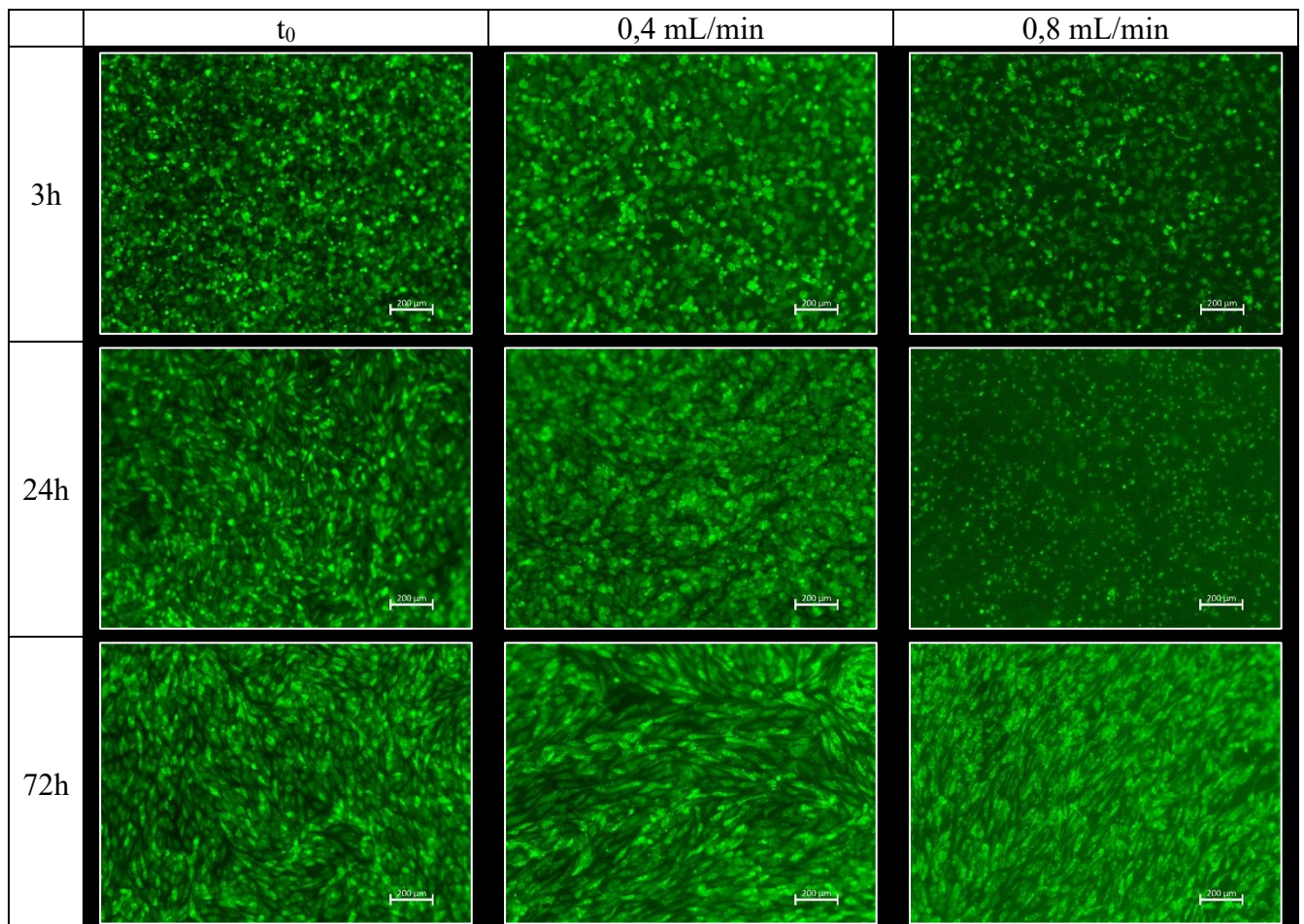


Abbildung 28: GFP-HUVECs innerhalb der Bioreaktor Kammer auf Fibrin Hydrogel. Es wird der Zeitpunkt t_0 , dargestellt, der den unmittelbaren Zeitpunkt vor Beginn der dynamischen Kultivierung darstellt. Diese startete nach 3 Stunden, 24 Stunden oder 72 Stunden. Dazu wurde zunächst für 24 Stunden ein Durchfluss von 0,4 mL/min und im Anschluss weitere 24 Stunden lang ein Durchfluss von 0,8 mL/min gewählt. Skalenbalken entsprechen 200 μm .

4.3 Biogedruckte Konstrukte

4.3.1 Einfluss der Kühlung auf die Viabilität der Endothelzellen

Der Einfluss des Temperaturabstieges während der Kühlung der HUVECs in der Gelatine wurde analysiert. Für die Auswertung wurde eine Lebend-/tot-Färbung nach vier Stunden und sieben Tagen Kultivierung durchgeführt. Abbildung 29 zeigt zunächst die Lebend-/tot-Färbung nach vier Stunden. Die Zellen wiesen eine rundliche Morphologie auf, jedoch waren nur einzelne tote Zellen (gekennzeichnet durch die roten Pfeile) zu erkennen. Nach sieben Tagen der Kultivierung haben sich die Zellen deutlich elongiert, während sie ihre natürliche Morphologie annahmen. Ein Großteil der Oberfläche war bedeckt und erneut waren nur sehr wenige tote Zellen auszumachen. Auch die Vergrößerte Aufnahme einer Probe nach sieben Tagen mit einem 40x Objektiv zeigte, dass die Morphologie ihrer natürlichen elongierten Form entsprach.

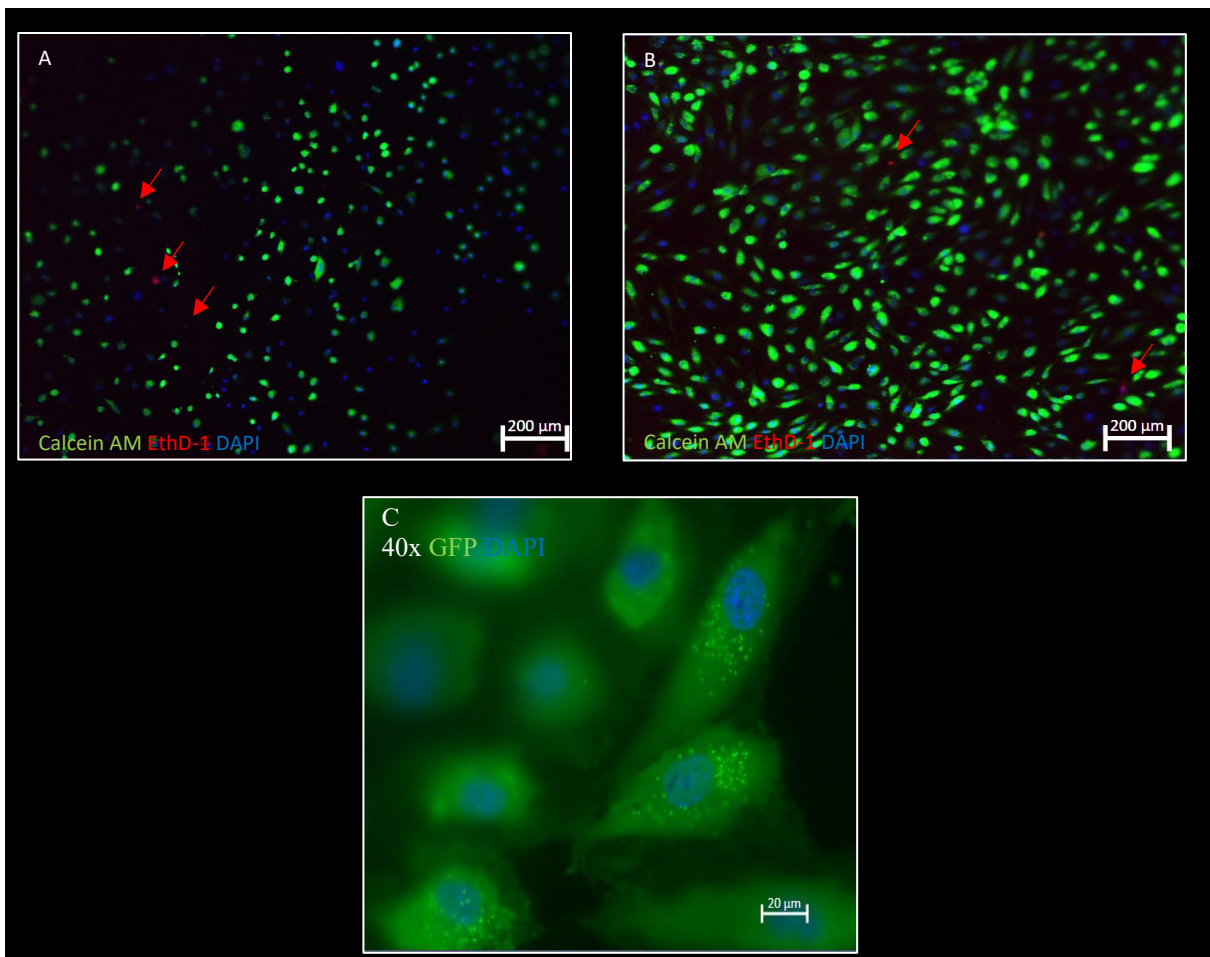


Abbildung 29: Einfluss auf die Viabilität der HUVECs durch die Kühlung der Biotinte. A zeigt eine Lebend-/tot-Färbung nach vier Stunden. B nach sieben Tagen Kultivierung. C zeigt eine 40-fache Vergrößerung nach sieben Tagen. Die roten Pfeile zeigen dabei auf die toten (rot) Zellen. Die Skalenbalken von A und B entsprechen 200 µm und in C 20 µm.

4.3.2 Bestimmung der Anhaftungszeit

Zunächst wurde erneut die Wahl des Hydrogels ermittelt. Dabei sollte es sich um ein stabiles Hydrogel handeln, welches nach dem Ausspülen des Gelatine-Kerns stabil genug war, um die Hohlstruktur aufrecht zu erhalten. Aus den Kompressionsversuchen konnte somit ermittelt werden, dass pures Fibrin oder in hoher Konzentration mit Kollagen gemischt (CF_{High}) in Frage kamen. Ebenfalls weisen diese beiden Hydrogele den geringsten Wasserverlust auf und sind somit über einen längeren Zeitraum stabil. Abbildung 30 zeigt zunächst in der linken oberen Ecke die Aufnahmen mit einer vier-fachen Vergrößerung. Des Weiteren wird neben dem DAPI-gefärbten Zellkern, mit einer 40-fachen Vergrößerung die Zellform der GFP-HUVECs gezeigt, sowie die Verteilung von FAK. Dabei wurde darauf geachtet, wie sich FAK verteilt und ob es zu Anlagerungen an bestimmten Knotenpunkten (in der Abbildung als Beispiele durch weiße Pfeile gezeigt) kam. FAK dient der Verankerung der Zellen an das Hydrogel. Die Proben wurden nach zwei, drei und vier Stunden fixiert und unter dem Mikroskop analysiert. Die Morphologie der Zellen war unabhängig vom Zeitpunkt der Fixierung und von dem Hydrogel durchgehend ähnlich. Die Zellen waren weder auffallend rund, was für ein nicht-anhaften oder absterben gesprochen hätte, noch wiesen sie eine auffallend elongierte Form auf. Ihre Form war vergleichbar mit den Vorversuchen. Betrachtet man die Proteine für fokale Adhäsion, so wird deutlich, dass sich diese über die ganze Zelle hinweg ausbreiteten. Jedoch wird auch deutlich, dass die Fokusebene (grün zu rot) unterschiedlich war. Ausgehend davon, dass es sich um eine einzelne Zellschicht handelt, könnten die Adhäsionspunkte mit dem Hydrogel unterhalb der Zelle gelegen haben. Die Ausbildung von fokalen Adhäsionspunkten wurde im Fibrin Hydrogel bereits nach drei Stunden deutlicher, während diese sich im CF_{High} erst nach vier Stunden deutlicher ausprägten. In der Abbildung 30 wird für die drei Stunden Fibrin Aufnahme deutlich, dass sich dort FAK vor allem am äußeren Rand der Zelle anlagerten. Dies geschah bei der Kombination aus Kollagen und Fibrin nach vier Stunden. Dennoch konnte aus diesem Versuch kein großer Unterschied zwischen Fibrin und der Kombination mit Kollagen geschlossen werden.

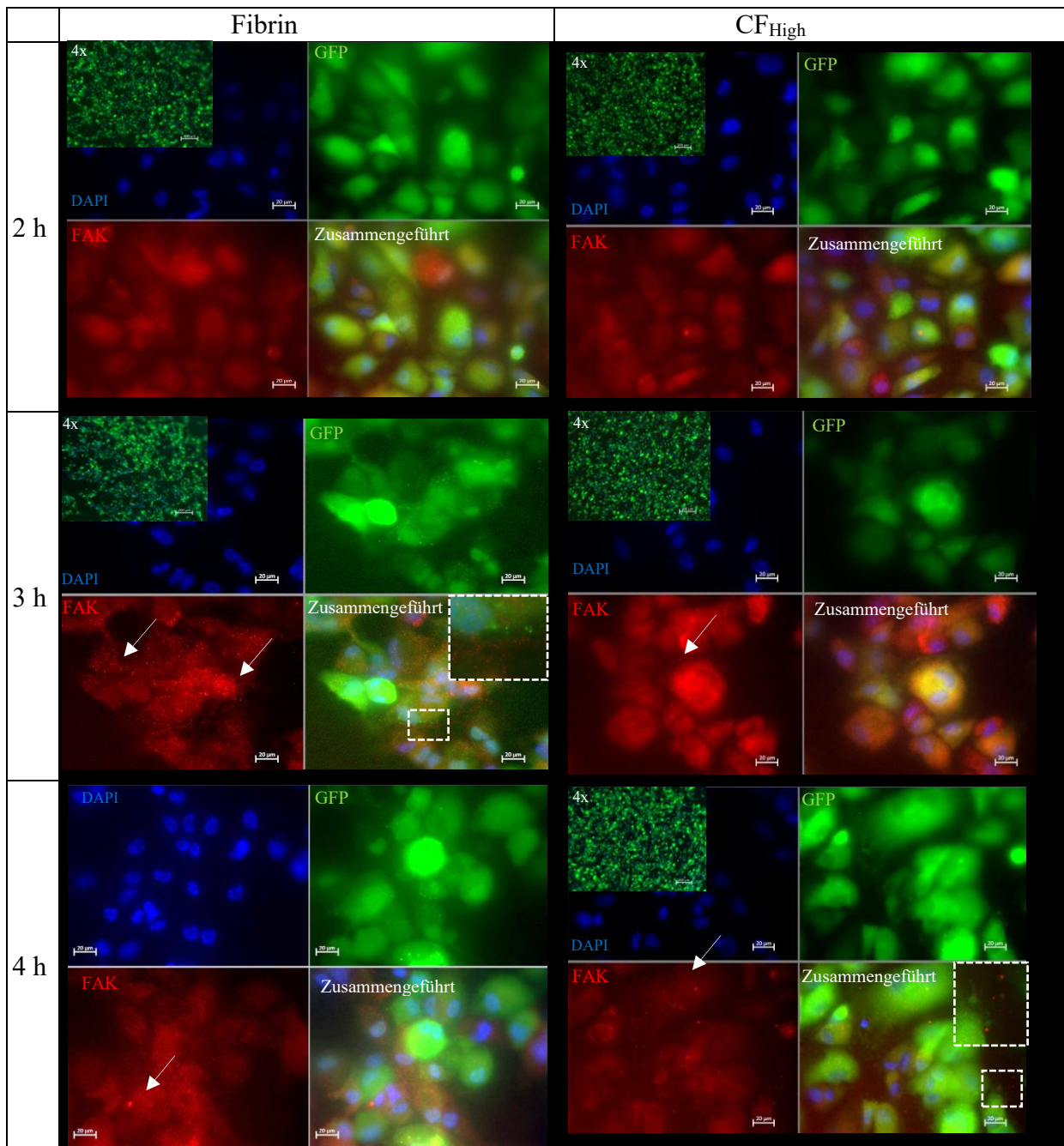


Abbildung 30: Aufnahmen zur Bestimmung der Anhaftungszeit von GFP-HUVECs (grün) nach zwei, drei und vier Stunden auf entweder Fibrin oder CF_{High} Hydrogel. Ebenfalls in rot dargestellt ist FAK, das fokale Adhäsionspunkte widerspiegelt. Der Zellkern ist mit DAPI (blau) eingefärbt. Die Skalenbalken der unterteilten Bilder entsprechen 20 µm und die Skalenbalken der Übersichtsbilder in der oberen linken Ecke entsprechen 200 µm.

Auch die nähere Betrachtung der Endothelschicht (siehe Abbildung 31) nach zwei, drei und vier Stunden wurde durchgeführt. Dabei zeigt sich, dass nach zwei Stunden bereits viele HUVECs an das Hydrogel anhafteten, jedoch noch deutliche Lücken zu erkennen waren. Die Zellen wiesen noch eine rundliche Form auf. Mit zunehmender Zeit nahm die Besiedlungsdichte an der Oberfläche zu. Die Abstände zwischen den Zellen wurden kleiner und waren nach vier Stunden lückenlos. Auch nach vier Stunden erschienen die Zellen noch rundlich. Ihre Größe hatte jedoch nach drei Stunden bereits zugenommen, da sie begannen sich zu elongieren.

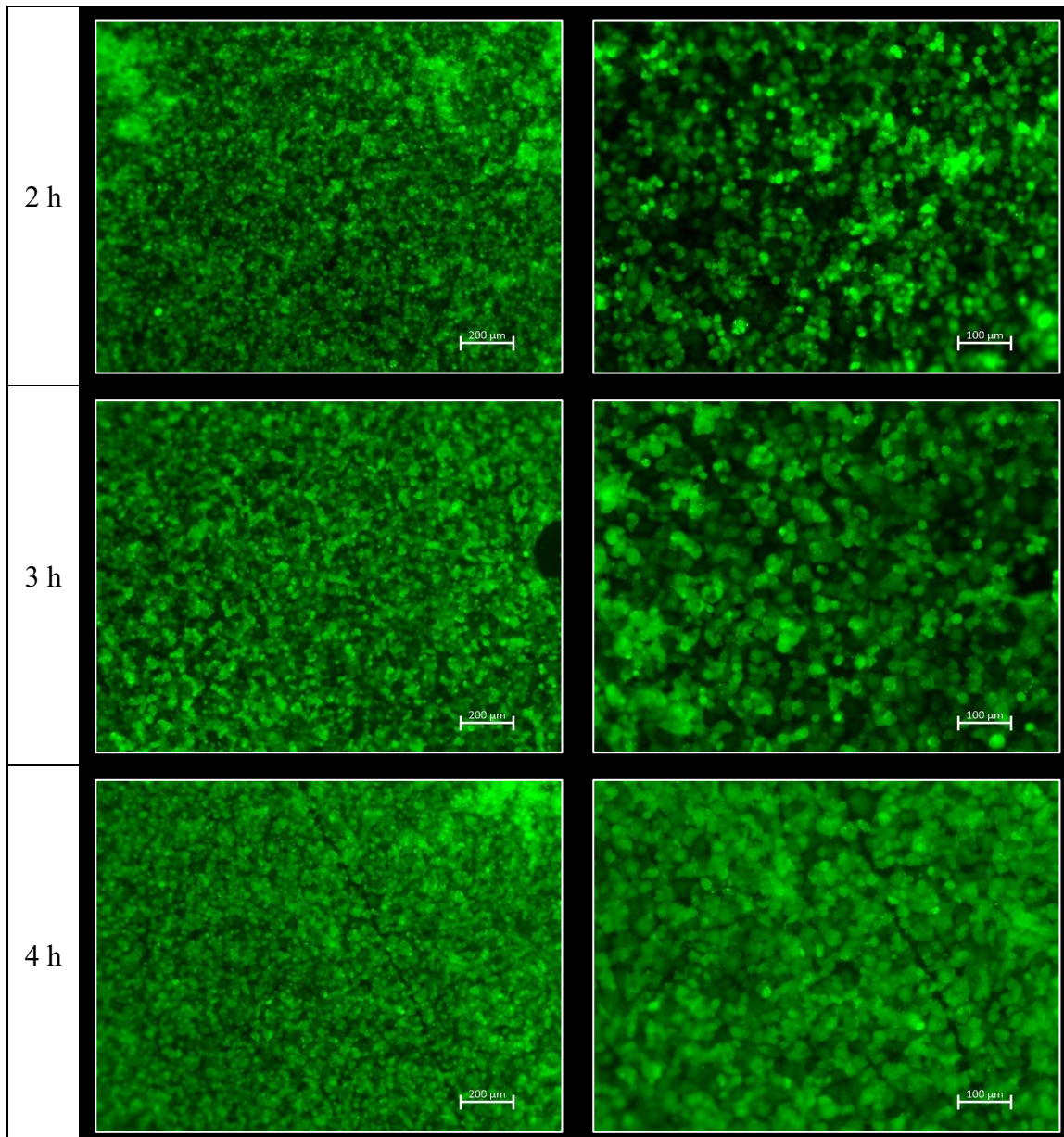


Abbildung 31: Aufnahme der GFP-HUVECs nach zwei, drei und vier Stunden. Skalenbalken in der linken Spalte entsprechen 200 µm und in der rechten Spalte 100 µm.

4.3.3 Einfluss Fibroblasten

Des Weiteren wurde untersucht, ob das Einbringen von Fibroblasten in die unter der HUVECs Schicht liegende Hydrogelmatrix einen Einfluss auf die Anhaftung der HUVECs hatte. Abbildung 32 zeigt dazu die fixierten und mit DAPI (blau) und VE-Cadherin eingefärbten Proben, nach drei Tagen statischer Kultivierung. Es zeigte, dass bei den zuvor untersuchten Hydrogelen (Fibrin und CF_{High}) nur geringe Unterschiede festzustellen waren. Die Zellschicht schien konfluent zu sein und das VE-Cadherin etwas stärker ausgeprägt. Bei dem Hydrogel CF_{Low} jedoch schien das Einbringen von Fibroblasten deutlich dazu beizutragen, dass HUVECs besser anhafteten. Die Zellschicht war konfluent ausgebildet und auch VE-Cadherin und somit die Zell-Zell Verbindungen stärker ausgeprägt. Dies zeigte sich vor allem auch deutlich in Abbildung 33. Ohne Fibroblasten, hafteten die Zellen deutlich weniger an der Matrix an und die Zellabstände waren größer im Vergleich. Durch das Einbringen von Fibroblasten, bildete

sich eine konfluente Zellschicht aus. Diese war jedoch wie zu erwarten, nicht eben und wies viele Unebenheiten in Form von Hügeln und Tälern auf.

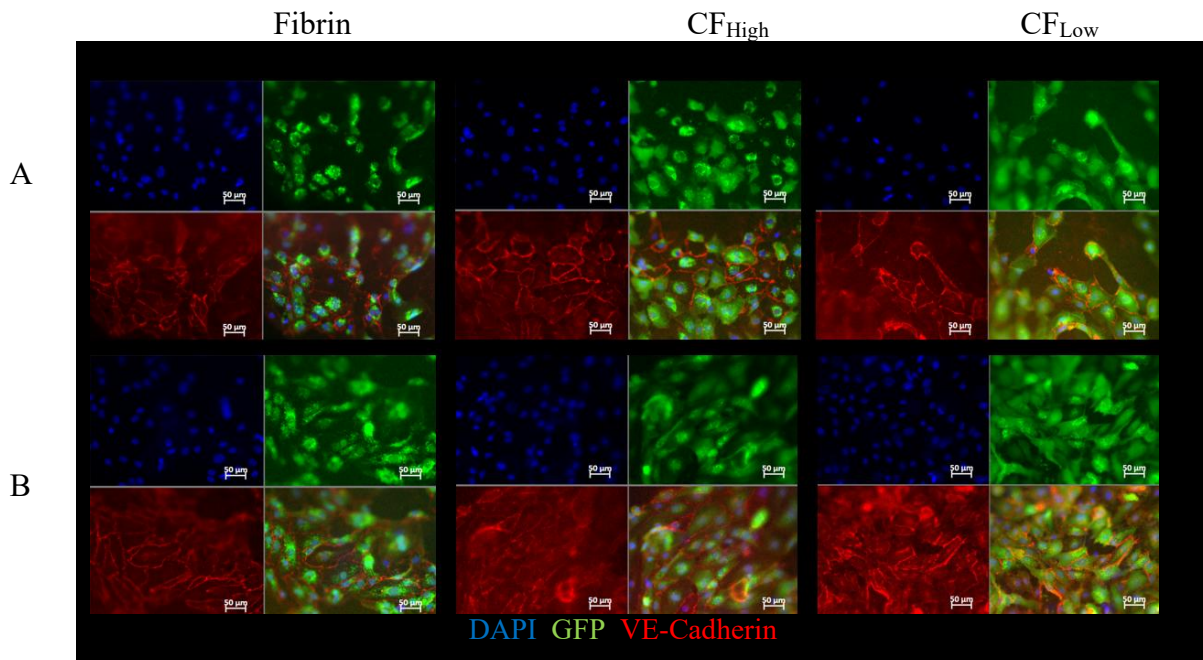


Abbildung 32: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Bestimmung des Einflusses von Fibroblasten in der darunter liegenden Matrix auf die Anhaftung der HUVECs. Die Zeile A zeigt die Aufnahmen ohne Fibroblasten und B mit Fibroblasten. Die Bilder zeigen in blau DAPI, in grün GFP und in rot VE-Cadherin, sowie das zusammengefügte Bild. Die Aufnahmen wurden nach drei Tagen der Kultivierung aufgenommen. Der Skalenbalken entspricht 50 µm.

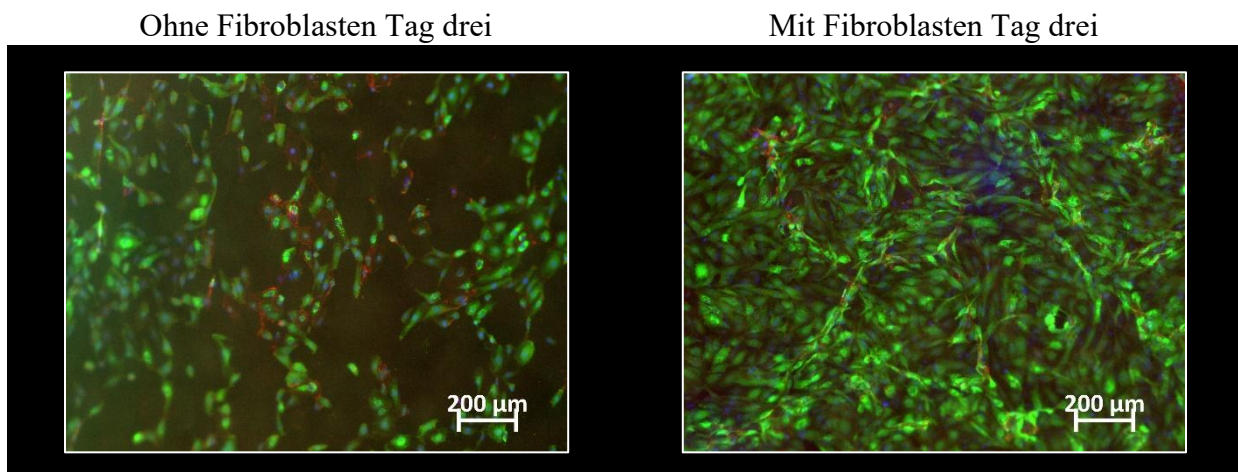


Abbildung 33: Vergleich der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Anhaftung von HUVECs auf der CF_{Low} Hydrogelmatrix mit und ohne Fibroblasten nach drei Tagen Kultivierung.

4.4 Vaskularisierung

Diese Versuche dienten als Vorversuche für die Erweiterung zum Lebermodell.

4.4.1 Kanaldesign

Zunächst wurden unterschiedliche Kanaldesigns inklusive der Ein- und Ausgänge im Bioreaktor simuliert (Simulation durchgeführt durch Ramin Nasehi (ZWBF) auf Grundlage von mir angefertigter CAD-Dateien) und miteinander verglichen (Abbildung 34). Dabei lag der Fokus auf den Stromlinien, sowie dem Geschwindigkeitsprofil innerhalb des gedruckten Kanals und den Wandscherspannungen dieser Kanäle. Betrachtet man in Abbildung 34 die Stromlinien, wird einer der Nachteile des alten Bioreaktors deutlich. Die Simulation zeigt, wie sich die Stromlinien durch die unterschiedlichen Querschnitte innerhalb des Bioreaktors veränderten und auch unterschiedliche Geschwindigkeiten aufwiesen. Der Bioreaktor besaß Querschnitte, die im Vergleich zum Ein-/Auslass des Reaktors und des gedruckten Kanaldesigns deutlich unterschiedlich waren. Ein weiter kritischer Punkt des alten Reaktors war zum einen der abrupte Unterschied vom Ein-/Auslass zum gedruckten Kanal, sowie die steilen Winkeländerungen innerhalb des Reaktors. Diese führten zu starken Geschwindigkeitsänderungen. Dies zeigte sich auch im Geschwindigkeitsprofil des Querschnittes. Direkt am Übergang von Bioreaktor zu gedrucktem Gefäß, konnten Geschwindigkeitsspitzen ausgemacht werden, die bis zu 4 mm/s erreichten, während es im einsträngigen Part des Doppelkanals auf eine Geschwindigkeit von 2 mm/s herunter ging und in der Doppelung eine Geschwindigkeit von ca. 1 mm/s aufwies. Diese Problematiken konnten mit dem neuen Bioreaktor behoben werden. Hier zeigte sich ein homogeneres Geschwindigkeitsprofil ohne Durchmesseränderungen oder starken Abwinklungen. Des Weiteren wurde wie gewünscht, innerhalb des komplexen Kanals eine Geschwindigkeitsverringerng innerhalb der schmalen Abzweigungen erreicht, während die Geschwindigkeiten in den parallelen Kanälen gleich blieben. Die Wandscherspannungen zeigten hingegen in allen gedruckten Kanälen, dass diese homogen verteilt waren. Während diese gleichmäßig bei ca. 5 mPa im parallelen Kanaldesign betragen, stimmt dieser Wert ebenfalls mit den einsträngigen Regionen der beiden anderen Kanäle überein. Durch die jeweiligen Abspreizungen kam es zur Verringerung der Wandscherspannungen auf ca. 2,5 mPa oder sogar 1 mPa im komplexen Kanaldesign der dünneren Abspreizungen.

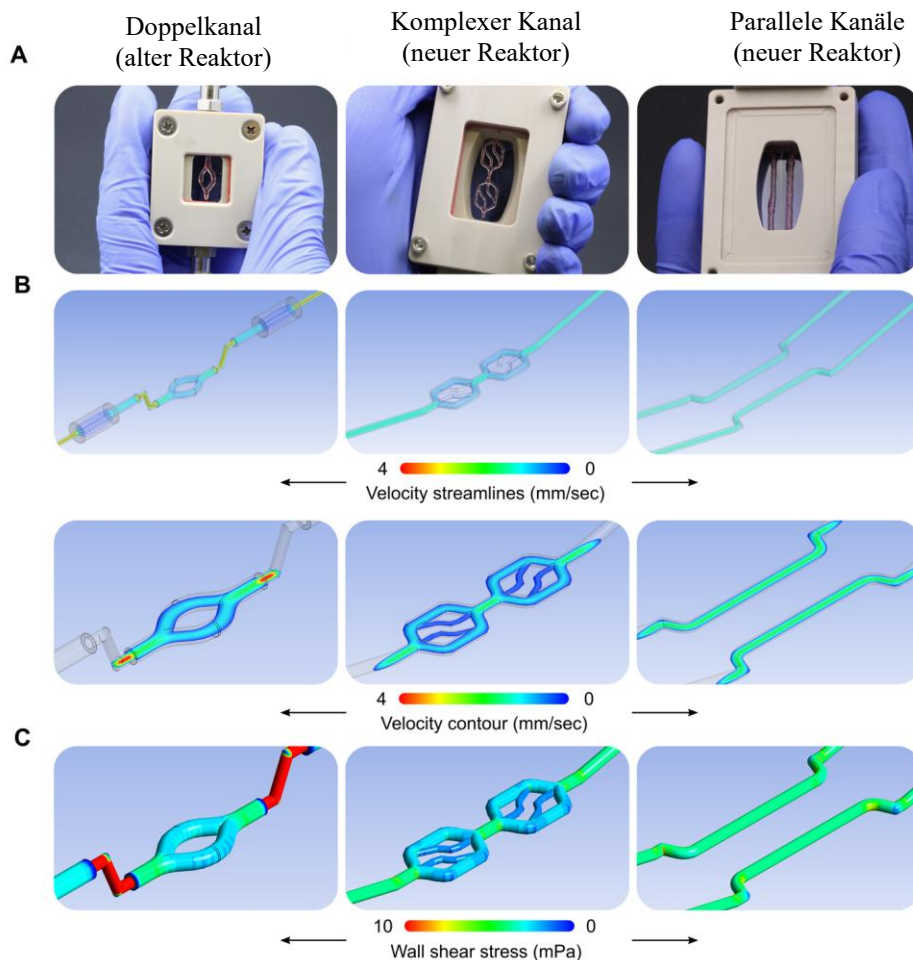


Abbildung 34: Simulationen der unterschiedlichen Designs für die zu druckenden Kanäle. (A) zeigt die gedruckten Gefäße mit roter Gelatine innerhalb der Bioreaktoren. (B) zeigt die Stromlinien des gesamten Weges, vom Beginn bis Ende des Bioreaktors, durch die gedruckten Kanäle in mm/s, sowie die Geschwindigkeitsprofile im Querschnitt der gedruckten Kanäle auch in mm/s. (C) zeigt die Wandscherspannungen der gedruckten Kanäle in mPa. [25]

4.4.2 Statische Untersuchungen

In beiden Hydrogelen (CF_{High} und CF_{Low}), konnte keine hypoxische Umgebung und somit kein klares Signal von $HIF\alpha$ nachgewiesen werden (Abbildung 35). Es zeigte sich jedoch, dass vereinzelt HUVECs sich im geringer konzentrierten Hydrogel deutlicher ausstreckten. In keinem der beiden Fälle bildeten die HUVECs komplexere Strukturen aus oder verbanden sich miteinander.

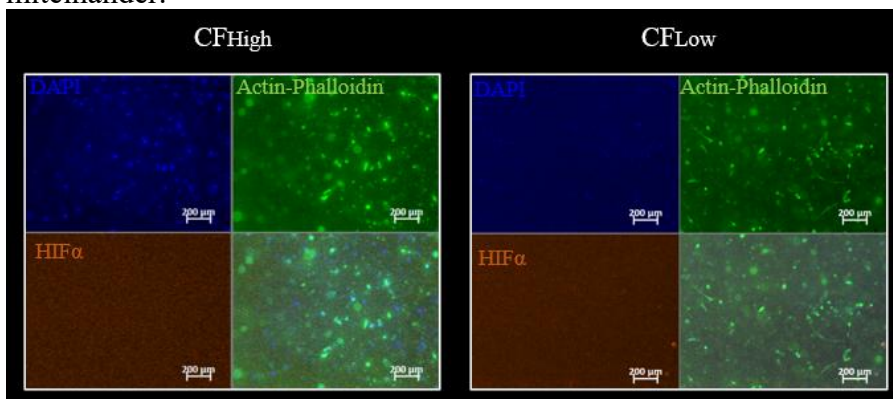


Abbildung 35: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zum Vergleich von $HIF\alpha$ (orange) von HUVECs in entweder CF_{High} oder CF_{Low} nach sieben Tagen Kultivierung.

In einem weiteren Versuch konnten vor allem im CF_{High} Hydrogel nach 14 Tagen Kultivierung bessere Ergebnisse erzielt werden (Abbildung 36). Die Proben wurden mit VE-Cadherin eingefärbt. Die DAPI-Färbung zeigte, dass im CF_{Low} Hydrogel mehr Zellen innerhalb des Bildausschnittes zu finden waren und diese enger bei einander lagen. Die Zellen im CF_{High} Hydrogel waren jedoch elongierter. Auch die Ausbildung von Zell-Zell Verbindungen in diesem Hydrogel, durch die VE-Cadherin Färbung in rot deutlich sichtbar, war in der Nahaufnahme deutlich stärker ausgeprägt, wobei die totale Anzahl dieser im geringer konzentriertem Hydrogel in höherer Anzahl zu erkennen war.

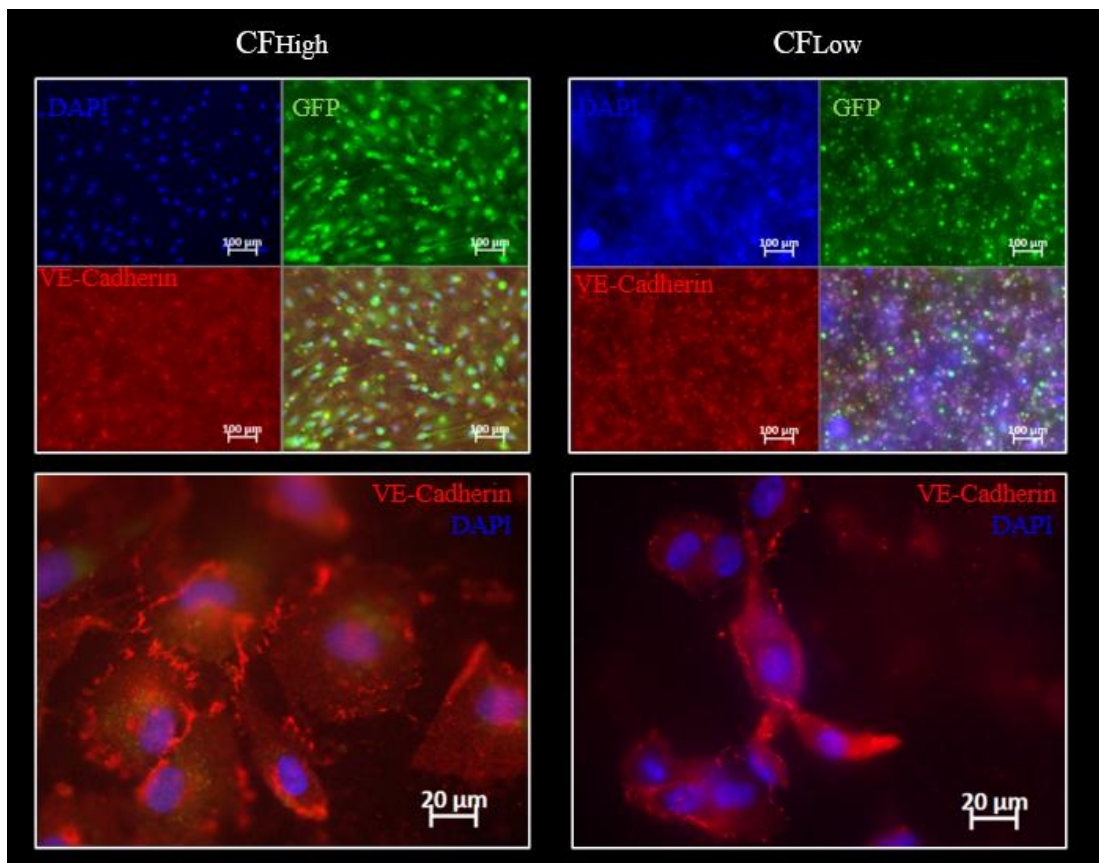


Abbildung 36: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GFP-HUVECs innerhalb des CF_{High} oder CF_{Low} Hydrogels nach 14 Tagen Kultivierung. In blau DAPI und in rot VE-Cadherin.

4.5 Lebermodell

4.5.1 Zweidimensionale Versuche

Mittels CCK-8 wurde die metabolische Aktivität und damit zusammenhängend die Proliferation von entweder HUVECs oder HepG2 Zellen alleine oder in deren Ko-Kultur mit unterschiedlichen Medien bestimmt und ausgewertet (Abbildung 37). Es zeigte sich, dass HepG2 Zellen in ihrem eigenem Medium (RPMI) stetig proliferierten. Nur an Tag sieben lag der Wert etwas niedriger als am Tag zuvor. Jedoch stieg dieser an Tag 10 dafür deutlich an und blieb ähnlich an Tag 15. Die Werte erreichten dabei an Tag 15 eine Prozentzahl von 143 % und somit ein Anstieg um 43 % seit Beginn. Wurden die Zellen in HUVECs VascLife Medium kultiviert, sahen die Werte ähnlich aus. Die Werte blieben durchgehend knapp unter 150 %, jedoch wiesen sie eine erhöhte Standardabweichung auf. Eine Verschlechterung der Proliferation war zu erkennen, wenn die HepG2 Zellen im gemischten Medium (Mix) kultiviert

wurden. Der Wert lag weiterhin oberhalb der 100 % Grenze, jedoch erreichte der maximal Wert an Tag 15 lediglich einen Anstieg von 26 %. Die CCK-8 Werte der HUVECs, die in ihrem Medium kultiviert wurden, fielen zunächst auf unter 100 % und betragen für die ersten sieben Tage nur 30 % was bedeutet, dass die metabolische Aktivität der Zellen um ca. 70 % abgenommen hatte. An Tag zehn hingegen ist ein deutlicher Anstieg der Aktivität zu erkennen wobei der Wert dann auf über 150 % und an Tag 15 sogar seinen maximalen Wert von 251 % erreichte. Auch im gemischten Medium war zunächst ein Abfall der Aktivität zu erkennen und die Werte fielen in der ersten Woche stark ab. An Tag zehn war erneut ein deutlicherer Anstieg zu erkennen, allerdings nicht bis auf das Anfangsniveau und so hielt sich der Wert bei 71 %. An Tag 15 war jedoch ein weiterer Anstieg der Aktivität zu messen und die HUVECs erreichten hier einen maximalen Wert an Tag 15 von 203 %. Dieser lag unterhalb des Wertes der kultivierten HUVECs in ihrem gewohnten Medium. Erstaunlicherweise ergab die Ko-Kultivierung beider Zellen im gemischtem Medium die besten Resultate. An Tag drei, stieg die Aktivität auf knapp unterhalb von 250 % an. Dieser Wert hielt sich über die erste Woche, wobei sich ein leichter Abfall zeigte. An Tag zehn und vor allem Tag 15 erreichten die Werte jedoch erneut einen Höchstwert. Tag 15 der Ko-Kultur im gemischten Medium besaß mit 268 % insgesamt den höchsten Wert der gemessenen Aktivitäten.

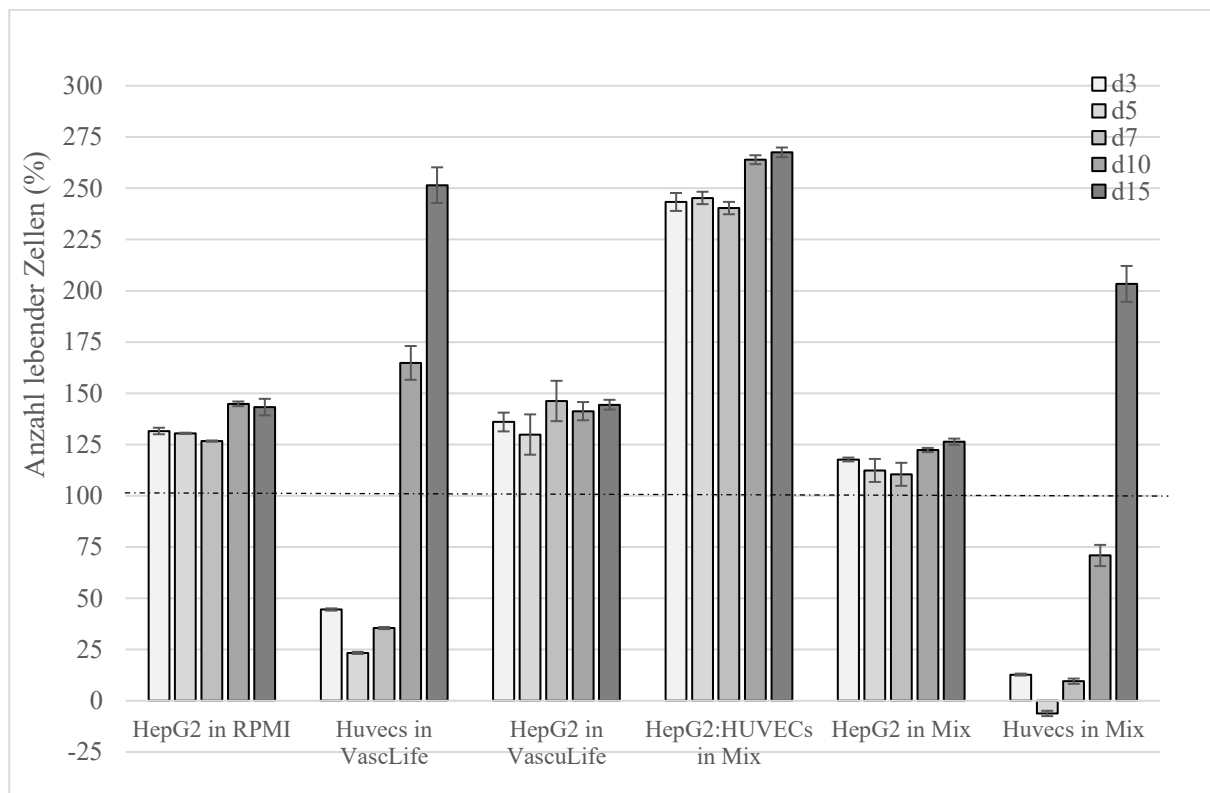


Abbildung 37: CCK-8 Ergebnisse der 2D Versuche von HepG2 oder HUVECs Zellen alleine oder in der Ko-Kultur mit entweder RPMI Medium, VascLife Medium oder dem Mix aus beiden Medien an Tag 1, 3, 5, 7, 10 und 15. Wobei 100 % den Anfangswert beschreibt und durch die gestrichelte Linie verdeutlicht wird.

4.5.2 Dreidimensionale Versuche

Mono-Kultur der Hepatozyten

Da die Leber im natürlichen Zustand eine hohe Konzentration an Zellen und eine geringere Konzentration an Matrix aufweist, wurde ebenfalls untersucht, ob es möglich ist, sechs oder sogar acht Millionen Zellen pro Milliliter CF_{Low} Hydrogel über längeren Zeitraum zu

kultivieren. Die Abbildung 38 zeigt zum einen, dass sich mit beiden Zellkonzentrationen, die typischen Ansammlungen bzw. Kluster an Hepatozyten ausbildeten. Dabei schien die Ansammlung bei der Konzentration von sechs Millionen Zellen pro Milliliter größer zu sein. Die Fotos zeigen ebenfalls, dass das Hydrogel bei acht Millionen Zellen pro Milliliter bereits nach sieben Tagen deutlich an Höhe verloren hat im Vergleich zu sechs Millionen Zellen pro Milliliter. Deutlich war vor allem während des Experiments, der hohe Verbrauch an Nährstoffen, bzw. die deutlich erhöhte Produktion an Abfallstoffen. Das Medium verfärbte sich aufgrund der Änderung des pH-Wertes deutlich schneller. Daher musste das Medium mindestens alle 24 Stunden gewechselt werden, wobei dieser Zeitraum für die höhere Zellkonzentration bereits zu lang erschien.

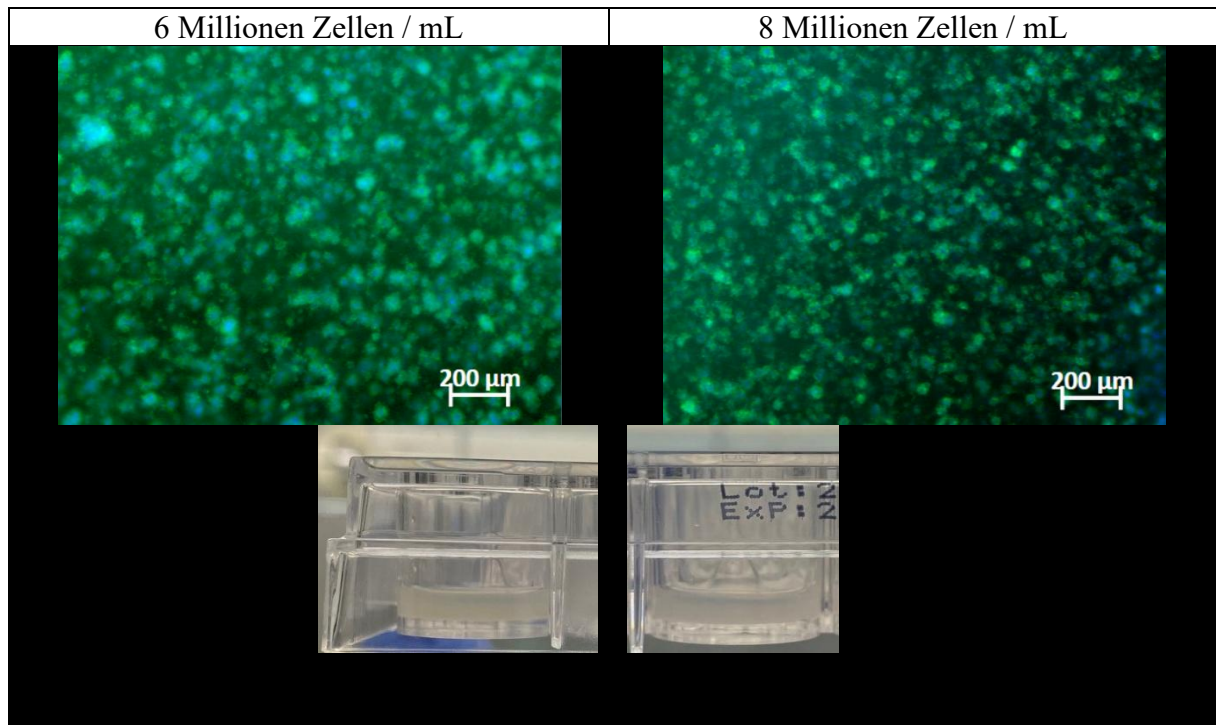


Abbildung 38: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Hepatozyten im Vergleich der Zellkonzentration von sechs und acht Millionen Zellen pro Milliliter im Hydrogel nach sieben Tagen Kultivierung. Ebenfalls sind Foto Aufnahmen der Hydrogele im Well zu sehen.

Dazu wurde weitergehend die Albuminkonzentration der Hepatozyten in den unterschiedlichen Hydrogel nach 14 Tagen Kultivierung im Mix-Medium untersucht. Abbildung 39 zeigt, dass sich die Hepatozyten im CF_{Low} Hydrogel zu größeren Klustern mit einer höheren Zellzahl pro Cluster ansiedelten. Ebenfalls war die Albuminproduktion in diesem Hydrogel höher, als in dem CF_{High} Hydrogel. Des Weiteren wird ersichtlich, dass die HepG2 Zellen längere Zellvorsprünge im geringer konzentriertem Hydrogel ausbildeten.

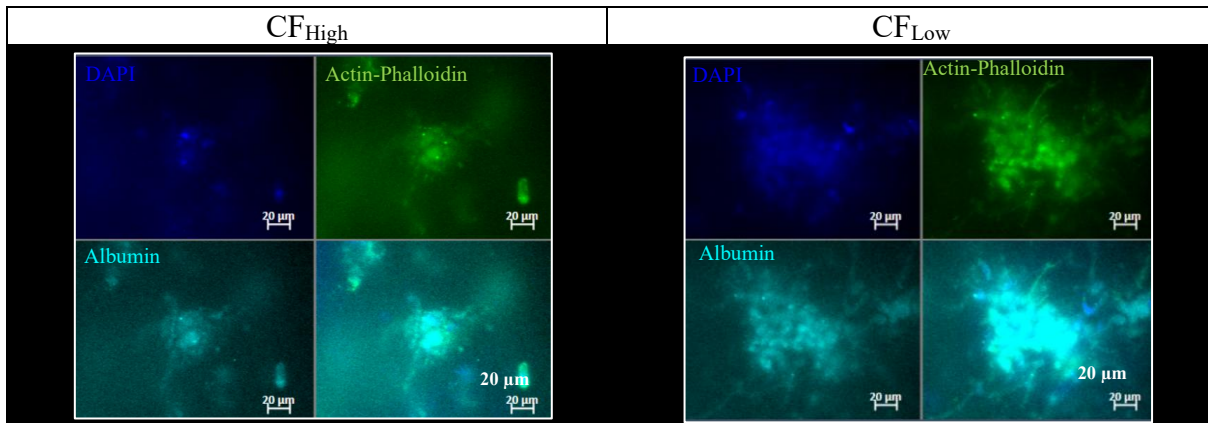


Abbildung 39: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Albuminproduktion von HepG2 Zellen in CF_{High} oder CF_{Low} Hydrogel nach 14 Tagen Kultivierung in Mix Medium. Der Zellkern in blau (DAPI), Das Zellgerüst in grün und Albumin in türkis. Der Skalenbalken beträgt jeweils 20 µm.

Ko-Kultur (HepG2, Fibroblasten)

In der Ko-Kultur wurde ebenfalls die Albuminproduktion zum einen in Abhängigkeit vom gewähltem Hydrogel und zum anderen vom Verhältnis der Hepatozyten zu den Fibroblasten (2:1 und 5:1) nach drei Tagen Kultivierung im Mix-Medium untersucht. Erneut zeigte sich im CF_{Low} Hydrogel eine starke Produktion an Albumin (Abbildung 40). Ebenfalls wies in dem Verhältnis von 5:1 Hepatozyten zu Fibroblasten im Vergleich zu 2:1 eine Erhöhung auf.

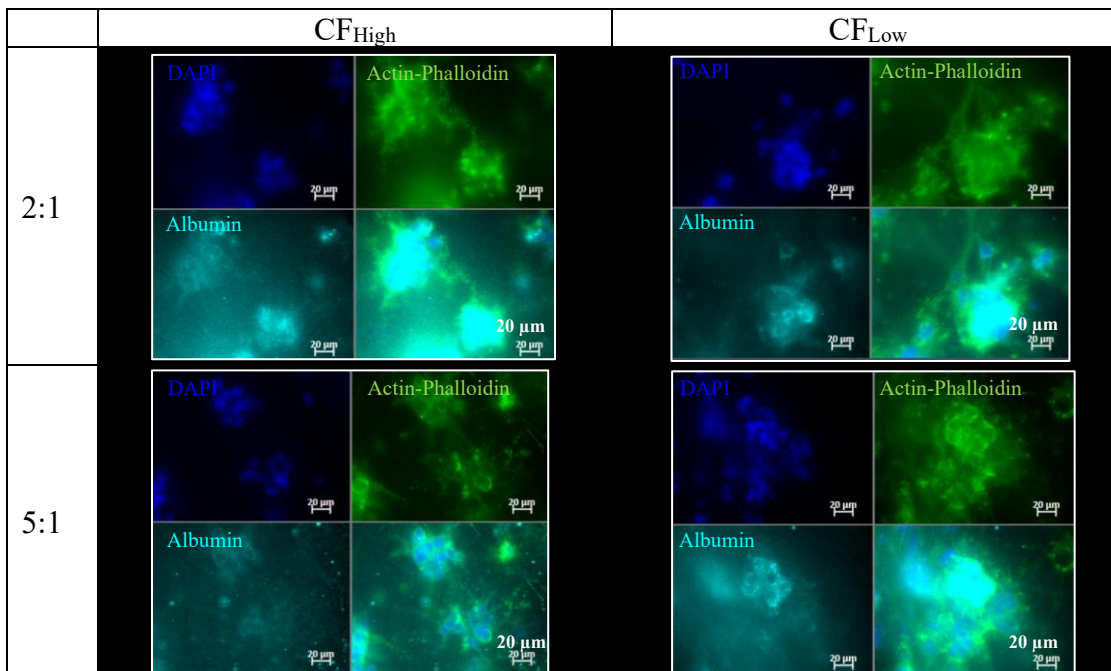


Abbildung 40: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Albuminproduktion nach drei Tagen Kultivierung in Mix-Medium mit einem Zellverhältnis von entweder 2:1 oder 5:1 Hepatozyten zu Fibroblasten. DAPI Einfärbung in blau, Actin-Phalloidin in grün und Albumin in türkis.

Dazu wurde auch das Protein MRP2 nach 14 Tagen untersucht. Im geringer konzentriertem Hydrogel befanden sich mehr Zellkerne (DAPI) und somit auch mehr Zellen im Bildausschnitt (Abbildung 41). Die Kluster der Hepatozyten in diesem Hydrogel waren größer und zum Teil ineinander verschmolzen oder durch die kleinen Zellausstülpungen der Hepatozyten

miteinander verbunden. Wie zu erwarten war, waren die größten Kluster für den Fall der HepG2 Zellen ohne Fibroblasten zu erkennen. In beiden Fällen der Ko-Kultur von HepG2 und Fibroblasten ließen sich kaum Unterschiede innerhalb des jeweiligen Hydrogels in der Größe der Kluster ausmachen. Die Färbung für MRP2 zeigte, dass dieses deutlich mehr im CF_{Low} Hydrogel vorhanden war, was allerdings auch an der Tatsache lag, dass deutlich mehr Zellen vorhanden waren. In der Vergrößerung von einzelnen Klustern ist kein Unterschied festzustellen, weder unter den Hydrogelen, noch unter dem Zellverhältnis der Ko-Kultur.

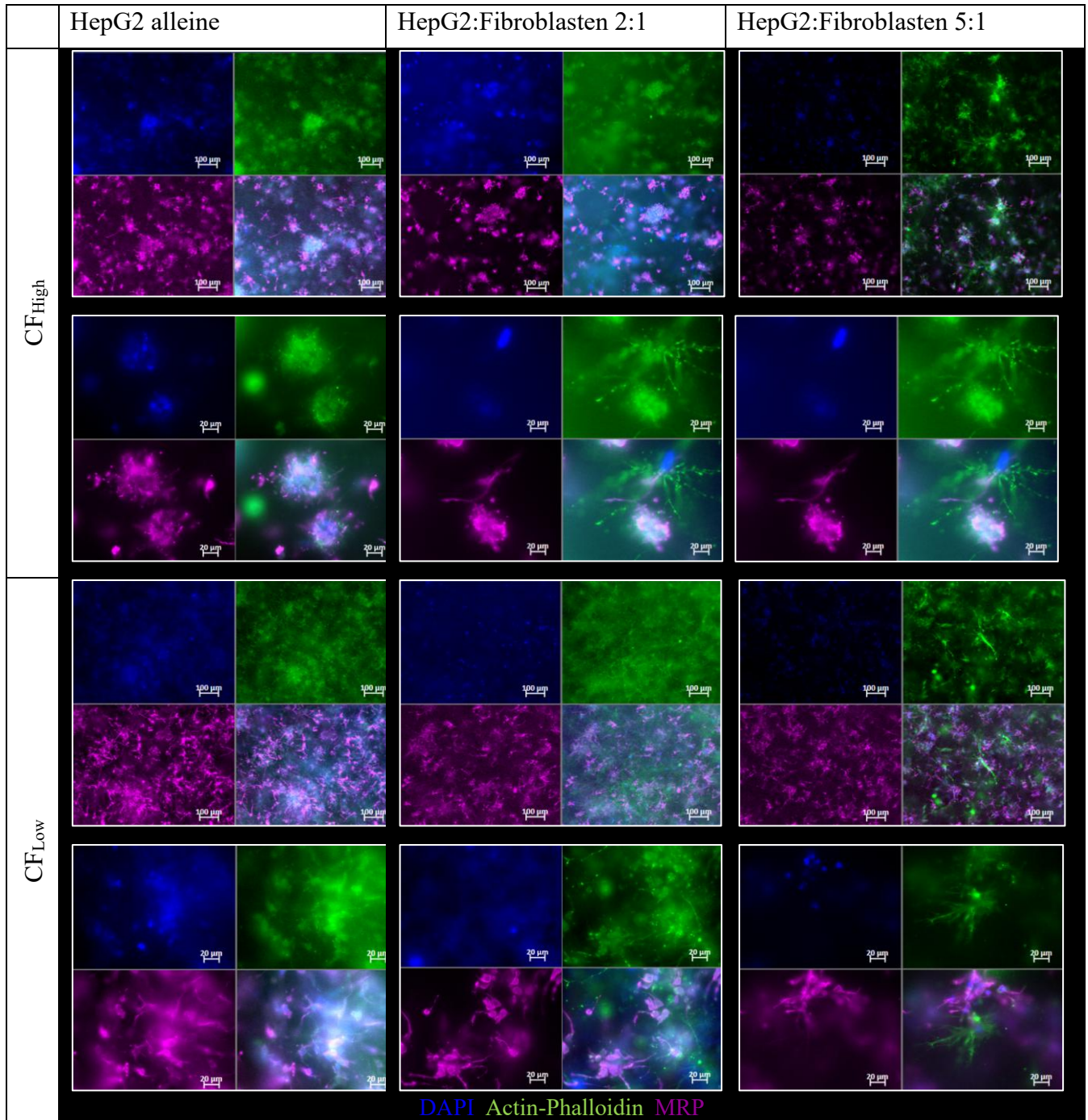


Abbildung 41: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen vom MRP2 Protein (violett) für HepG2 allein, oder in Ko-Kultur mit Fibroblasten in einem Verhältnis von 2:1 oder 5:1. Die Kultivierung fand über 14 Tage im Mix-Medium statt. Der Zellkern ist in blau eingefärbt, sowie das Zellgerüst in grün.

Während der Experimente mit der Ko-Kultur von Hepatozyten und Fibroblasten fiel vor allem die Interaktion der Fibroblasten mit den Hepatozyten auf (Abbildung 42). Dabei spielte zunächst die Art des Hydrogels keine Rolle. Die Hepatozyten ordneten sich zu den gewohnten Klustern an. Die Fibroblasten waren vereinzelt anzufinden und spreizten sich ebenfalls, wie sie es auch in der 2D-Kultur machen würden weit aus. Jedoch fiel auf, dass ihre Zellausstülpungen zu den Hepatozyten-Klustern reichten und so durch einen Fibroblasten mehrere Cluster miteinander verbunden waren. Dabei kam es ebenfalls zu Verbindungen über weitere Distanzen von einem Fibroblasten zum anderen. Die Länge dieser Ausstülpungen war in dem niedrig konzentriertem Hydrogel länger und ausgeprägter und erschien auch breiter. Ebenfalls fiel auf, dass auch die Hepatozyten diese Ausstülpungen, wenn auch von deutlich geringerer Länge, vor allem im CF_{Low} Hydrogel ausbildeten.

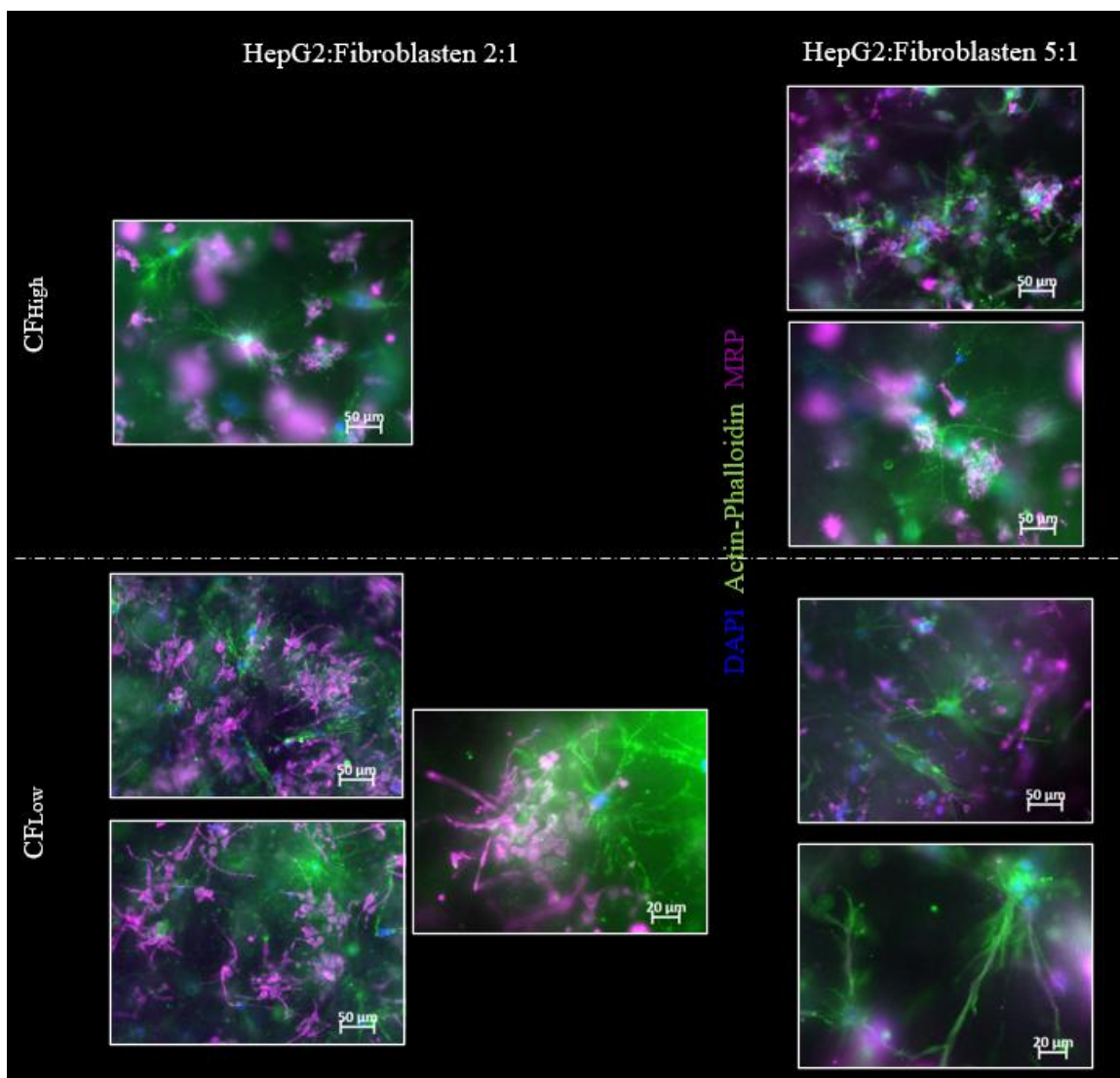


Abbildung 42: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, die die strukturelle Verflechtung der Zellausläufer von Fibroblasten (nur grün) mit den Hepatozyten (sichtbar durch MRP2 in violett) in den unterschiedlichen Hydrogelen zeigen.

Tri-Kultur (HepG2, HUVECs, Fibroblasten)

Ebenfalls wurde die Albuminproduktion der Tri-Kultur von HepG2, HUVECs und Fibroblasten (4:2:1) verglichen (Abbildung 43). Dabei wurde zum einen zwischen den Medien (EGM und Mix Medium), sowie der Wahl des Hydrogels (CF_{High} oder CF_{Low}) unterschieden. Wie in den

Vorversuchen, zeigte sich eine größere Ansammlung an Hepatozyten im CF_{Low} Hydrogel. Im Vergleich zum EGM Medium, produzierten die HepG2 Zellen mehr Albumin im gemischten Medium. In der höher konzentrierten Matrix war eine klarere Abgrenzung des Albumins zu erkennen, während es sich in der geringer konzentrierten Matrix zu verteilen schien.

Die Albumin-Menge im Medium wurde ebenfalls wie im Material und Methoden Abschnitt beschriebene gemessen. Jedoch zeigte sich, dass die Methode nicht für die Proben anwendbar war. Die Zellen produzierten entweder zu wenig Albumin oder das Medium beeinflusste die Messungen, da der Wert der Hintergrundstörung (Medium alleine) zum Teil höher lag, als der gemessene Wert mit Zellen. Dies galt auch im 2D-Versuch. Aus diesem Grund werden die Ergebnisse hier nicht weiter erwähnt.

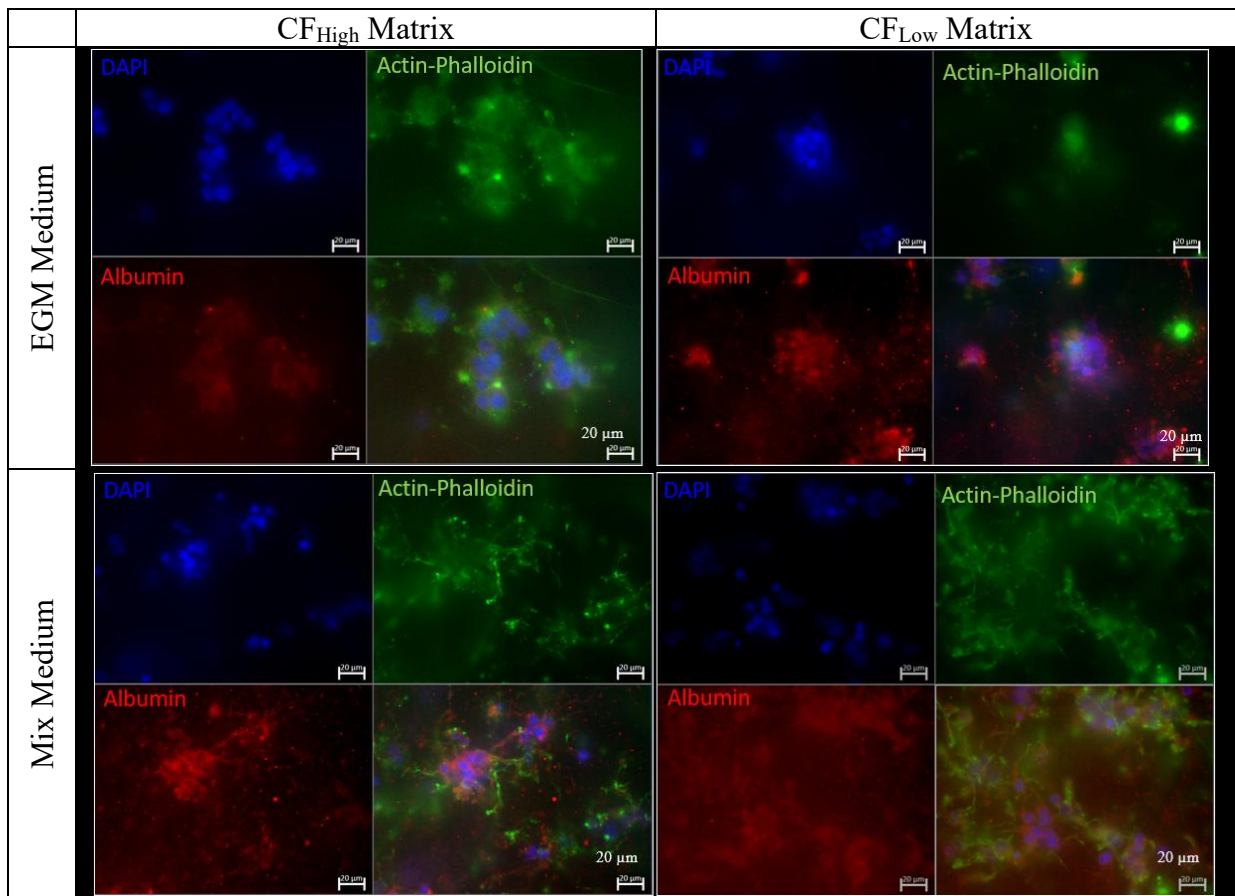


Abbildung 43: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Tri-Kultur von HUVECs, Fibroblasten und HepG2 Zellen in entweder CF_{High} oder CF_{Low} Matrix. Dabei wird ebenfalls unter EGM oder gemischtes (Mix) Medium zur Kultivierung unterschieden. Zu sehen ist der Zellkern in Blau (DAPI), Actin-Phalloidin in grün und Albumin in rot. Der Zeitraum der Kultivierung betrug sieben Tage. Der Skalenbalken entspricht 20 μm .

Die Ergebnisse stimmten ebenfalls mit den Untersuchungen für das Protein MRP2 überein (Abbildung 44). Für das CF_{Low} Hydrogel war erneut eine größere Ansammlung von Hepatozyten zu erkennen. Ebenfalls war die MRP2 Produktion deutlich im Vergleich zum CF_{High} Hydrogel erhöht.

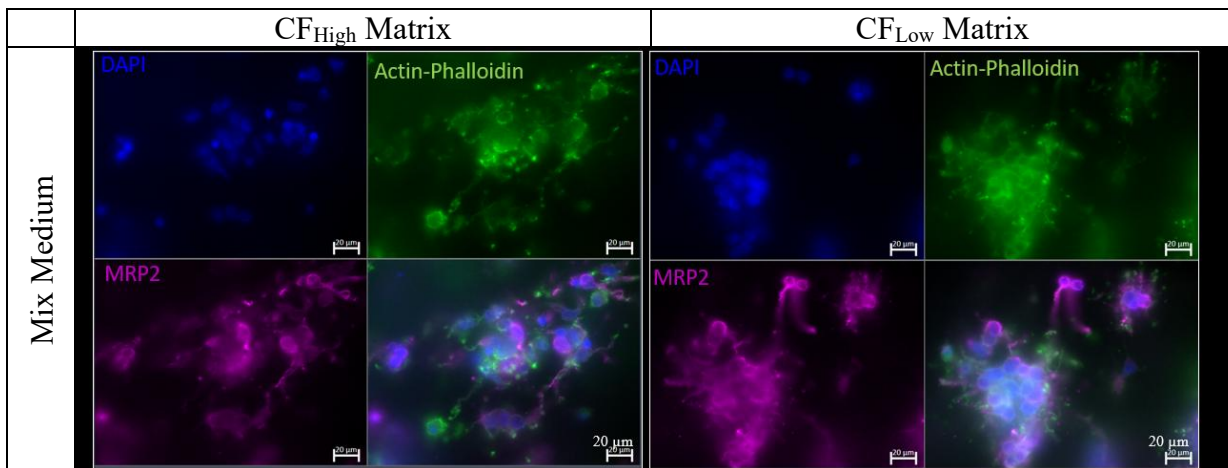


Abbildung 44: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Bestimmung von MRP2 (violett) der Tri-Kultur im gemischten Medium nach sieben Tagen Kultivierung in unterschiedlichen Hydrogelen. Der Skalenbalken entspricht 20 µm.

4.5.3 Dynamische Kultivierung

Abbildung 45 zeigt die dynamische Kultivierung für drei Tage nach einer statischen drei-Tages-Phase des Leber *In-vitro*-Modells. Dieses bestand aus 3D-gedruckten parallel verlaufenden Kanälen, die mit GFP-HUVECs ausgekleidet waren. Es zeigte sich, dass die statische Kultivierung von drei Tagen im Bioreaktor von gedruckten Hohlstrukturen deutlich schlechtere Ergebnisse erzielte, als in der Wellplatte oder im umgedrehten Bioreaktor Versuch. Die GFP-HUVECs kleideten nur zum Teil die Gefäßwand aus und bildeten keine konfluente Endothelschicht. Auch innerhalb des Hydrogels verhielten sich die HUVECs eher ungesund, da sie sich nicht elongierten, sondern eher in ihrer runden Form blieben. Durch die dynamische Kultivierung erhielten die HUVECs innerhalb des Kanals eine leichte Orientierung, bildeten aber weiterhin keine deckende Endothelschicht aus. Innerhalb des Hydrogels begannen jedoch einzelne Zellen sich auszustrecken und sogar zum Teil mit den Klustern der Hepatozyten zu interagieren. Die Hepatozyten bildeten auch in diesem Versuch Kluster aus.

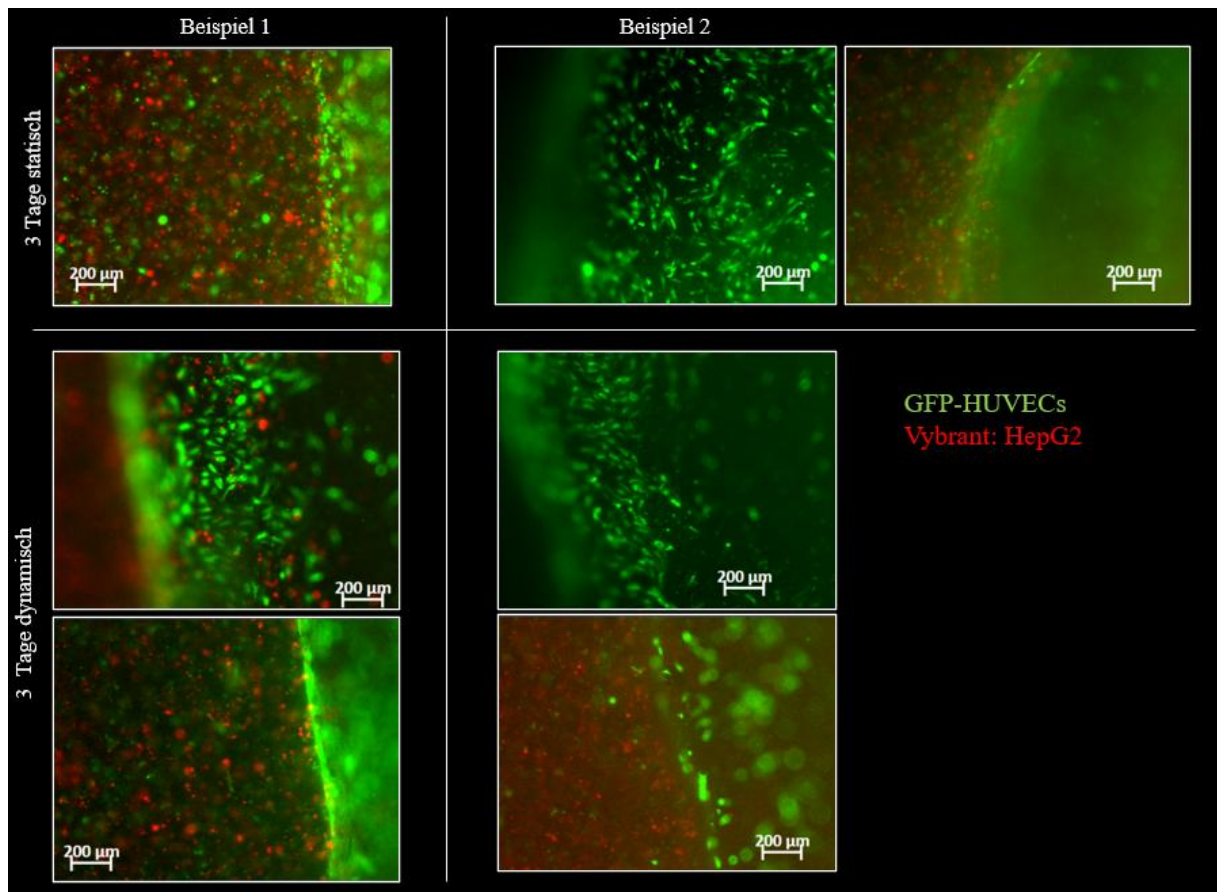


Abbildung 45: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der dynamischen Kultivierung im Doppelkanal mit der Ko-Kultur aus GFP-HUVECs (grün) und Vybrant eingefärbte HepG2 Zellen (rot). Diese waren in dem CF_{Low} Hydrogel zwischen den beiden Kanälen eingebracht. Die Kanäle wurden 3D-biogedrukt und waren mit GFP-HUVECs ausgekleidet. Der restliche Raum des Bioreaktors wurde mit CF_{High} Hydrogel ohne Zellen aufgefüllt. Die Kultivierung fand zunächst drei Tage statisch und im Anschluss drei Tage dynamisch mit einer Durchflussrate von 0,01 mL/min und dem Mix Medium statt.

Ebenfalls wurde die Tri-Kultur entweder im Doppelkanal oder im komplexen Kanal (zweimal hintereinander innerhalb eines Reaktors) dynamisch für insgesamt sechs Tage kultiviert. In Abbildung 46 wird der komplexe Kanal während der dynamischen Kultivierung an Tag eins, drei und Tag sechs gezeigt. Die gedruckte Struktur war auch nach sechs Tagen noch deutlich zu erkennen. Jedoch zeigte sich auch, dass sich nach Tag sechs der innere Part des komplexen Kanals vom Glas abgelöst hatte und sich blasen dort sammelten, welche für die Ablösung gesorgt haben könnten. Aus diesem Grund wurde der Versuch an dem Zeitpunkt abgebrochen. Die HUVECs im Kanal zeigten an Tag eins noch ihre typische Zellstruktur, die sich leicht elongiert hatte. Sie kleideten die Kanalwand aus und begannen bereits sich auszuspreizen. Innerhalb der Hydrogelmatrix behielten sie jedoch ihre runde Form bei und verhielten sich eher ungesund. Auf dem Bild ganz rechts von Tag eins ist allerdings auch gut zu erkennen, dass der Übergang von Kanal zu Matrix durch eine einzelne HUVECs Schicht abgetrennt ist und das soweit wie möglich an Tag eins eine homogene Endothelschicht die Kanalwand auskleidete. Ähnliche Beobachtungen konnten an Tag drei gemacht werden. Die Kanalwand war weiterhin größtenteils mit HUVECs bedeckt, die einzelne Endothelschicht bestand weiterhin, jedoch konnten erste Bereiche ausgemacht werden, in denen die HUVECs weniger konfluent waren. Während sie sich in diesen Bereichen jedoch weiter ausstreckten, wurden die Abstände selbst zwischen den einzelnen Zellen größer. Ebenfalls blieb die Form innerhalb des Hydrogels

weiterhin rundlich. Nach sechs Tagen dynamischer Kultivierung musste der Versuch abgebrochen werden, da sich die innere Matrix vom Glas löste und auch die HUVECs fast vollständig abgestorben waren. Die gedruckten Strukturen waren nur noch teilweise zu erkennen während in einem Bioreaktor Luftblasen ausgemacht werden konnten.

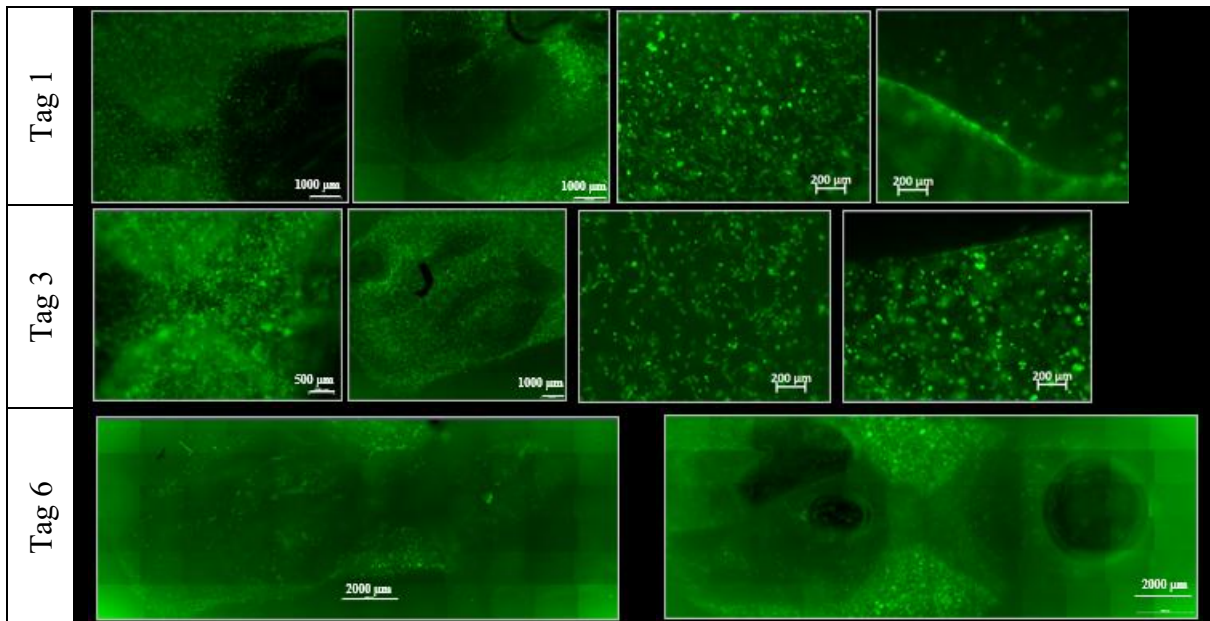


Abbildung 46: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der GFP-HUVECs innerhalb des Bioreaktors während der dynamischen Kultivierung an Tag eins, drei und sechs. Gedruckt wurde der komplexe Kanal zweimal hintereinander. Innerhalb der Gefäße befindet sich die Tri-Kultur von GFP-HUVECs, HepG2 und Fibroblasten. Die HepG2 und Fibroblasten sind auf dem Bild nicht zu sehen, da diese nicht zuvor eingefärbt wurden.

4.6 Tumormodell

Abbildung 47 und Abbildung 48 zeigen im Vergleich eingebettete Fibroblasten in Monokultur oder in Ko-Kultur mit GFP-HUVECs in der umgebenden Hydrogelmatrix, nach zwölf, sieben und zehn Tagen dynamischer Kultivierung mit eingebettetem A431 Triple-Tumor-Sphäroid. Es zeigte sich, dass die schmalere Kanäle in Abbildung 47 sich vor allem in unmittelbarer Nähe zum Tumor-Sphäroiden neu formieren und eine komplexere Vernetzung ausbildeten. Jedoch war auch nach zwölf Tagen keine direkte Ausbildung von Mikrokanälen in Richtung des Tumors festzustellen. In Abbildung 48 strukturierten sich die GFP-HUVECs, die sich innerhalb der Matrix befanden, ebenfalls zu einer komplexen Struktur. Vor allem der rote Ausschnitt zeigt, wie die HUVECs sich vom großen gedruckten Kanal in die Matrix hinein ausrichten und miteinander vernetzten. Die Kanalwand war nach zwölf Tagen dynamischer Kultivierung (Abbildung 47) weiterhin konfluent mit einer Endothelschicht bedeckt. In beiden Fällen war die zuvor gedruckte Struktur auch nach langer dynamischer Kultivierung stabil. Die Anzahl der Fibroblasten in unmittelbarer Nähe zum Tumor nahmen ab und die verbliebenen waren weniger ausgestreckt (Abbildung 47).

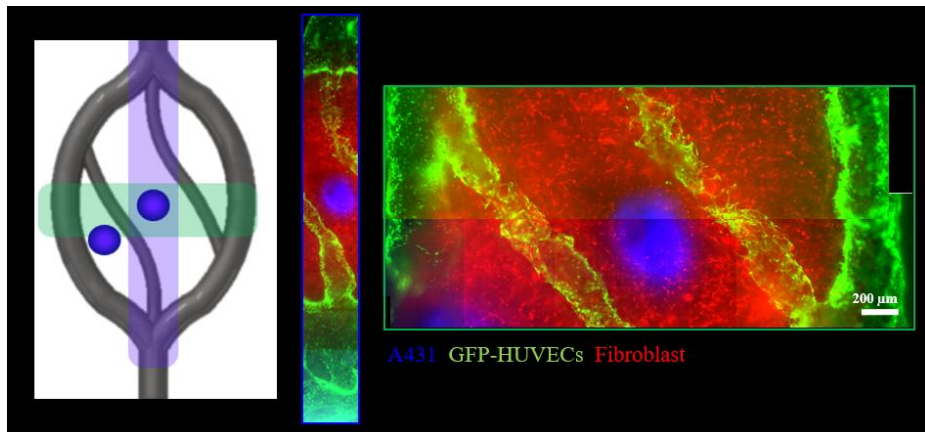


Abbildung 47: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach zwölf Tagen der dynamischen Kultivierung von 3D-biogedruckten GFP-HUVECs (grün) Kanälen, sowie Fibroblasten (rot) allein eingebettet in der umgebenden Matrix. Des Weiteren ist ein A431 Triple-Tumor-Sphäroid (blau) in diese Matrix eingebettet.²

Auffällig in Abbildung 48 ist, dass vor allem die HUVECs in unmittelbarer Nähe oder aber auch in der Randzone der Kanäle, an denen sich die Tumore befanden, abstarben und somit die Verbindung des inneren Netzwerkes zu den großen Kanälen unterbrachen. Dieses Phänomen wurde auch in den grün markierten Zonen direkt um den Tumor herum von Tag sieben zu Tag zehn verstärkt beobachtet, während die Verbindung auf der gegenüberliegenden Seite und somit weiter entfernt vom Tumor weiter bestehen blieb oder sogar weiter ausbildete und die HUVECs sich stärker selbst formatierten.

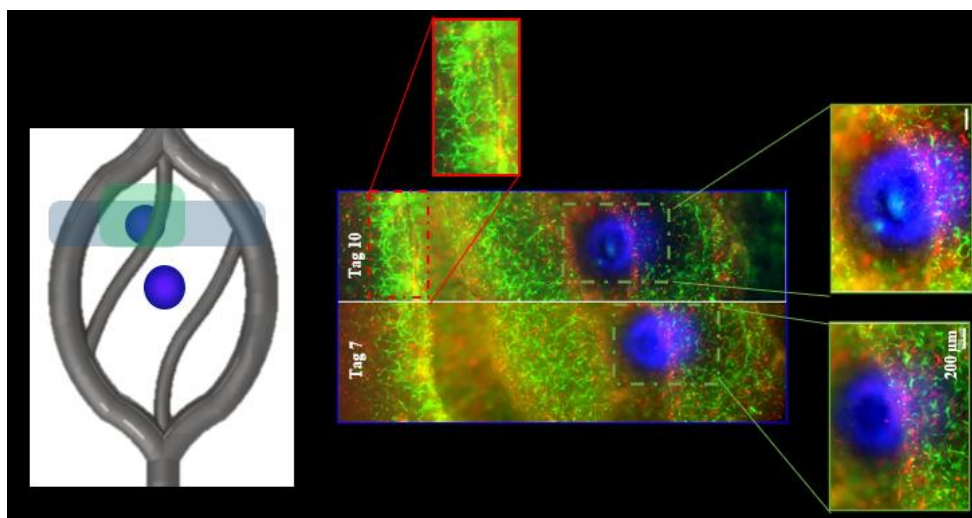


Abbildung 48: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen an Tag sieben und zehn der dynamischen Kultivierung von 3D-biogedruckten GFP-HUVECs (grün) Kanälen, sowie Fibroblasten (rot) in Ko-Kultur eingebettet in der umgebenden Matrix. Des Weiteren ist ein A431 Triple-Tumor-Sphäroid (blau) in diese Matrix eingebettet.²

² Die Zellkulturversuche für das Tumor Model erfolgten in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Experimentelle Molekulare Bildgebung der RWTH Aachen (ExMI, Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Fabian Kießling). Die Zell-Kultivierung und die Bildgebung wurden von Frau Federica De Lorenzi (ExMI) durchgeführt.

4.7 Herstellung von Mikrokanälen

4.7.1 Erstellung von Mikrokanälen mittels PDMS-Stempel-Methode

Nach der Optimierung der Pluronic-Beschichtung sowie der Befüllung mit Gelatine, der anschließenden Verfestigung dieser und dem Ablösen der Stempel, wurden folgende Resultate erzielt. Abbildung 49 zeigt die vier einfachen großen Gelatine-Stränge. Es sind klare Kanten dieser zu erkennen, was zeigt, dass die Gelatine nicht aus den Formen gelaufen ist. Die Formen gaben einen Durchmesser von 1,5 mm vor. Die anschließende Analyse von vier Kanälen an jeweils fünf unterschiedlichen Messstellen unter dem Mikroskop ergab, dass die Kanäle einen durchschnittlichen Durchmesser von 1,6 mm und dabei eine sehr geringe Standardabweichung von lediglich 44 μm aufwiesen. Dies konnte ebenfalls durch die Messung von weiteren Kanälen, hergestellt mittels eines weiteren Stempels, nachgewiesen werden, wobei die durchschnittliche Kanalbreite ebenfalls bei 1,6 mm lag.

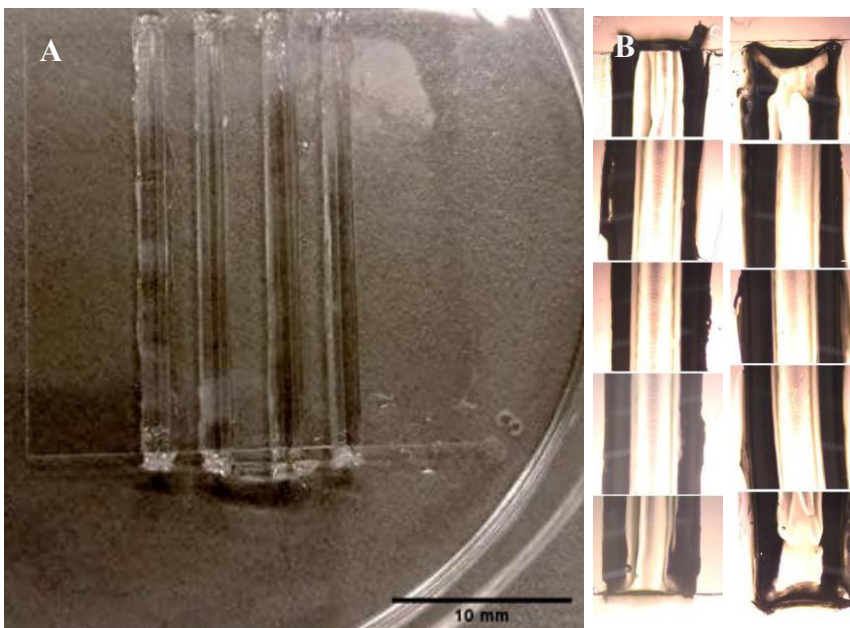


Abbildung 49: Gelatine-Kanäle. (A) Foto von vier ausgelösten Kanälen auf dem Deckglas. (B) Lichtmikroskopische Aufnahme von zwei Kanälen, welche von zwei unterschiedlichen Stempeln stammen. Die Kanten sind klar abzugrenzen und die Reproduzierbarkeit mittels dieser Methode wird deutlich. Skalenbalken entspricht 10 mm.

Im nächsten Schritt wurden die größeren Kanäle mit den schmaleren Verbindungskanälen zusammengeführt. Dazu wurden die 3D-gedruckten Formen mit den lithographisch hergestellten Wafern kombiniert und neue PDMS-Stempel erzeugt. Diese wurden wie zuvor beschrieben mit Pluronic benetzt und mit Gelatine befüllt. Abbildung 50 zeigt exemplarisch das resultierende Gelatinegeflecht. Die größeren Stränge sind dabei gleichmäßig durch kleine Stränge miteinander verbunden. Die Oberfläche ist dabei glatt und eben und die Kanten klar abgegrenzt.

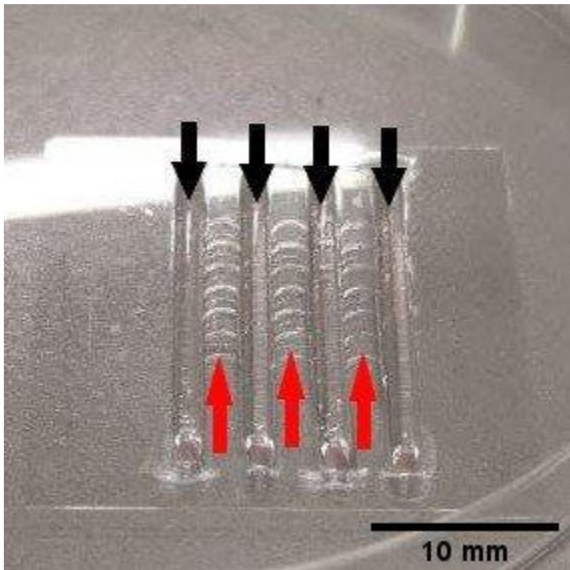


Abbildung 50: Foto des Gelatinegeflechts durch die Verbindung von vier großen Strängen (schwarze Pfeile) mit jeweils kleineren (33 μm oder 50 μm im Durchmesser) Kanälen (rote Pfeile).

Eine weitere Analyse unter dem Mikroskop bestätigte dabei, dass die großen Stränge durch die kleinen Stränge ohne Unterbrechungen miteinander verbunden waren (Abbildung 51). Ebenfalls wurden die klaren Kanten und die glatte Oberfläche erneut bestätigt. Dies gilt für die 50 μm breiten Stränge, sowie auch für die 33 μm breiten Stränge. Erneut war eine erhöhte Breite festzustellen, wie zuvor auch für die größeren Stränge. Für die vorgegebenen 33 μm war eine Zunahme von knapp 6 %, also 2 μm im Durchschnitt zu erkennen. Die Standardabweichung war, mit 4 μm , sehr gering und zeigte eine gute Reproduzierbarkeit, sowie homogenen Verteilung an. Dies galt auch für die 50 μm vorgegebenen Stränge. Dabei ergab die Analyse einen Mittelwert von 52 μm (Abweichung von 4 % von der Vorgabe) mit einer Standardabweichung von 3 μm .

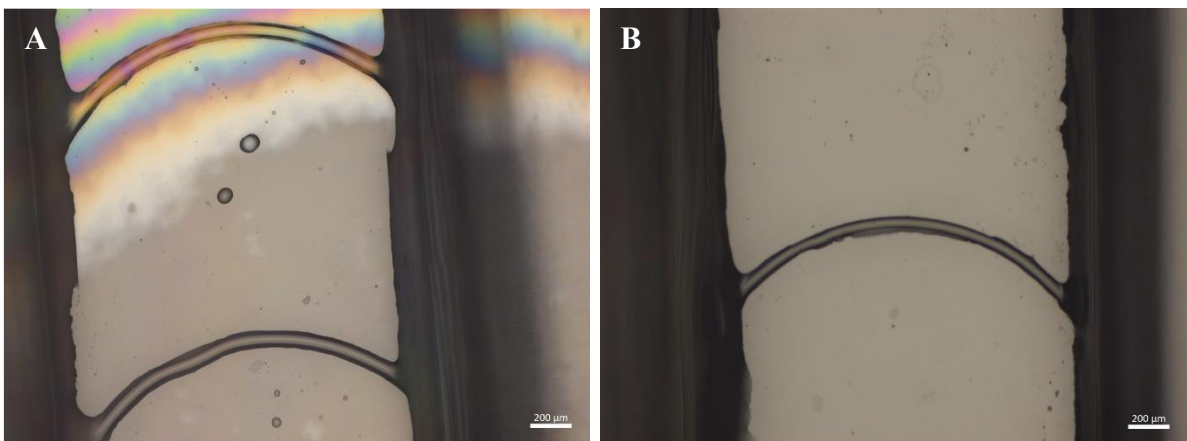


Abbildung 51: Mikroskopie Aufnahmen der (A) 50 μm und (B) 33 μm Verbindungskanäle. Es ist deutlich zu erkennen, dass die großen Stränge durch die schmalere ohne Unterbrechung verbunden sind. Skalenbalken entspricht 200 μm .

Im nächsten Schritt wurden Zellen (HUVECs) in die Gelatine eingebracht und die Stränge in ECM-Hydrogel eingegossen. Zuvor wurde überprüft, ob die Zellen überhaupt die Mikrokanäle besiedeln konnten. Dazu wurden wie zuvor beschrieben Mikroskopieaufnahmen der zellbeladenen Gelatine-Stränge aufgenommen. Der Kern der HUVECs wurde mit Hoechst eingefärbt, um sie unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen (Abbildung 52). Die

Aufnahmen wurden im weiteren Verlauf auf die Anzahl der Zellkerne ausgewertet. In beiden Strukturgrößen waren Zellen zu erkennen. Die anschließende Zählung ergab einen Mittelwert von sechs Zellen in den 50 μm breiten Strängen und vier Zellen in den 33 μm breiten Strängen. Damit wurde gezeigt, dass beide Größen für weitere Versuche geeignet waren.

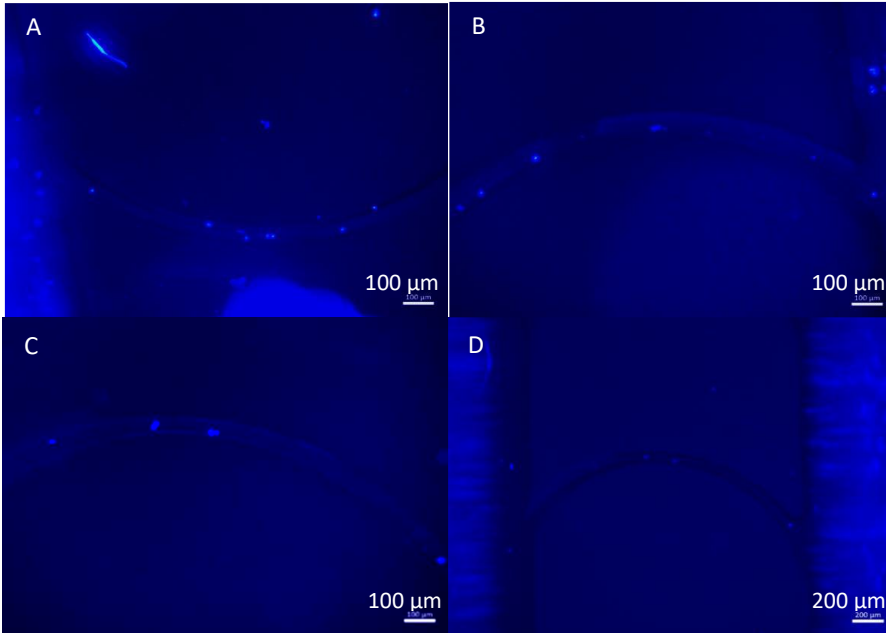


Abbildung 52: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mit Hoechst eingefärbten HUVECs in den Mikrogelatine-Strängen.

4.7.2 Erstellung von Mikrokanälen mittels Doppel-Opfermaterial-Methode

In Abbildung 53 zeigt sich die Verjüngung der resultierenden Gelatine-Stränge im Bereich des Einlasses. Diese variierten vom breitesten Abschnitt mit 1162 μm (C rechte Seite) bis hin zur dünnsten Stelle mit 11 μm (A, B und linke Seite von C). Die resultierenden Gelatine-Stränge im Bereich des Auslasses betragen ca. 240 μm , während der zentrale Abschnitt eine Breite von ca. 475 μm aufwies.

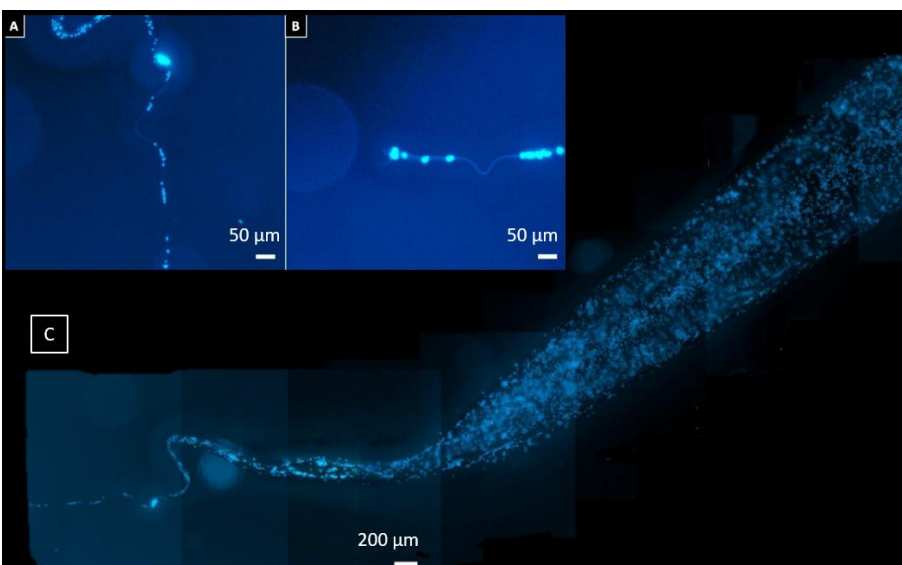


Abbildung 53: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Gelatine Stränge. In ihnen befinden sich HUVECs deren Zellkern mit Hoest (blau) eingefärbt wurde. A und B entsprechen dabei den dünnsten Abschnitten und C zeigt die Verjüngung dieser Stränge.

Des Weiteren wurden unterschiedliche Zellkonzentrationen untersucht. Dabei zeigte sich, dass unabhängig von der Konzentration die HUVECs in der Gelatine agglomerierten. Diese Anhäufung von Zellen blieb für eine Konzentration von $6 \cdot 10^6$ Zellen/mL auch bestehen, wenn das Hydrogel über die Gelatine Struktur gegeben und die Gelatine nach Anhaftung der Zellen ausgespült wurde. Aus diesem Grund wurde die Zellkonzentration auf $4 \cdot 10^6$ Zellen/mL reduziert. Abbildung 54 zeigt den Vergleich von sechs und vier Millionen Zellen pro Milliliter Gelatine, nachdem die Gelatine ausgespült wurde.

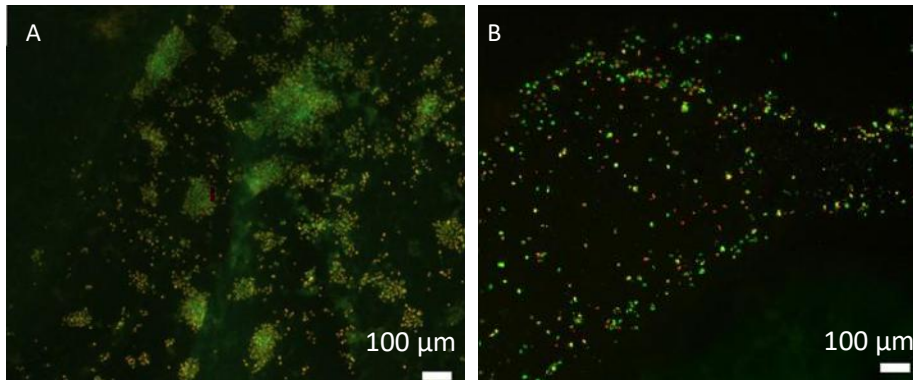


Abbildung 54: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Lebend-/Tot-Färbung von HUVECs zum Vergleich der Zellkonzentrationen von (A) $6 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter und (B) $4 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter HUVECs. Die Zellen wurden mit der Lebend-/tot-Färbung eingefärbt, nachdem die Zellen am Hydrogel anhaften konnten und die Gelatine im Anschluss ausgespült wurde.

Unterschiedliche Hydrogel-Konzentrationen wurde miteinander verglichen, welche entweder über die Gelatine-Stränge pipettiert oder die Stränge hineingebettet wurden. Dabei zeigt Abbildung 55 die Ergebnisse für zwei unterschiedliche Hydrogele. Zum einen wurde in A ein Hydrogel mit einer Konzentration von 2,0 mg/mL Kollagen mit 16,7 mg/mL Fibrin verwendet und mit in B gezeigter Konzentration von 1,7 mg/mL Kollagen mit 20,8 mg/mL Fibrin verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass beide Hydrogele geeignet sind, da in beiden Fällen die Zellen anhaften und die Hohlstrukturen nach dem Auswaschen der Gelatine stabil blieben.

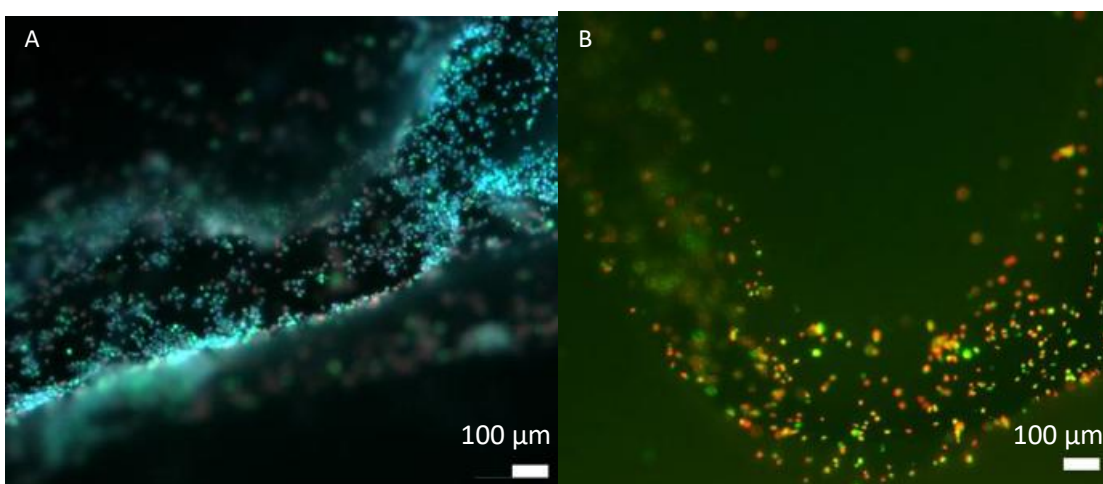


Abbildung 55: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von unterschiedlichen Konzentrationen an Kollagen-Fibrin Hydrogelen, die um die Gelatine Stränge gegeben wurden. (A) Eingefärbte HUVECs (Hoechst in blau, sowie Lebend-/tot-Färbung in rot und grün) mit einer Hydrogel-Konzentration von 2,0 mg/mL Kollagen und 16,7 mg/mL Fibrin. (B) Konzentration von 1,7 mg/mL Kollagen und 20,8 mg/mL Fibrin.

Die Strukturen wurden auch nach der statischen Kultivierung analysiert. Dazu wurden diese nach 14 Tagen Kultivierung in der Petrischale, wie in Abbildung 56 gezeigt, nach dem Fixieren mit Actin-Phalloidin (grün), VE-Cadherin (rot) und DAPI (blau) eingefärbt. Es fällt auf, dass die Zellen ihre anfängliche runde Form behielten. Die HUVECs haben keine gleichmäßige Zellschicht entlang der Kanalwand ausgekleidet, da sie sich nicht elongierten. Dies wird auch durch eine nur schwache Ausbildung von VE-Cadherin die Zell-Zell Verbindungen anzeigt, deutlich, da die Zellabstände zu groß waren. Es konnte durch die gewählte Mikroskopieart nicht eindeutig geklärt werden, ob weiterhin eine Hohlstruktur aufrecht erhalten werden konnte, oder ob die Kanäle kollabiert sind.

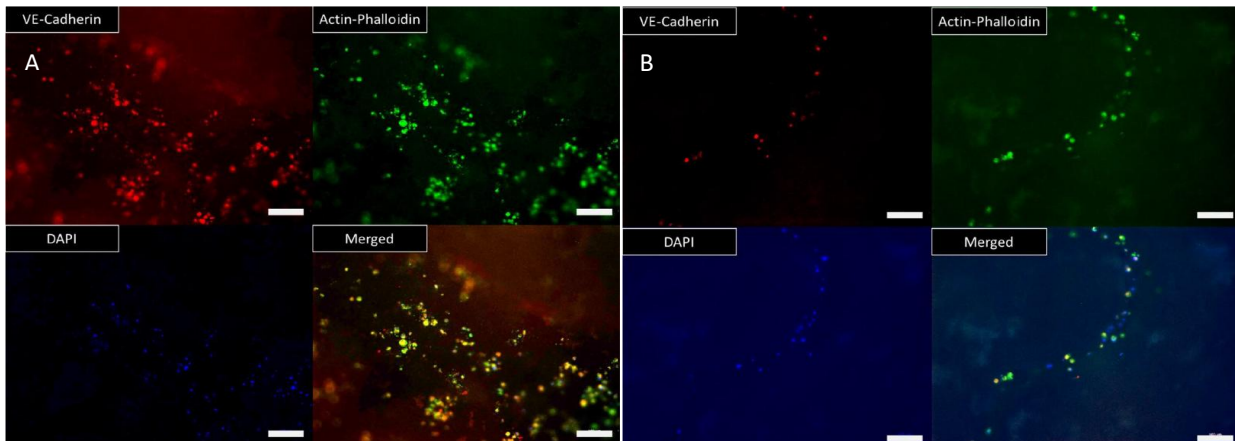


Abbildung 56: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HUVECs nach 14 Tagen der statischen Kultivierung in der Petrischale. Diese wurden nach der Fixierung mittels PFA mit den Antikörpern für Actin-Phalloidin (grün), VE-Cadherin (rot) und DAPI (blau) eingefärbt. A) Beispiel eines Kanals der größer als 100 µm ist. B) Kanal kleiner als 100 µm. Die Skalenbalken entsprechen 100 µm.

Die Zellform änderte sich jedoch in der dynamischen Kultivierung (Abbildung 57). Die Zellen reagierten auf die mechanische Beanspruchung durch die Strömung, indem sie sich etwas ausdehnten und Zellausstülpungen ausbildeten. Jedoch konnte sich auch hier keine homogene Schicht an Zellen mit stabilen Zell-Zell-Verbindungen ausbilden, auch wenn das Signal von VE-Cadherin im Vergleich zum statischen Versuch etwas stärker war.

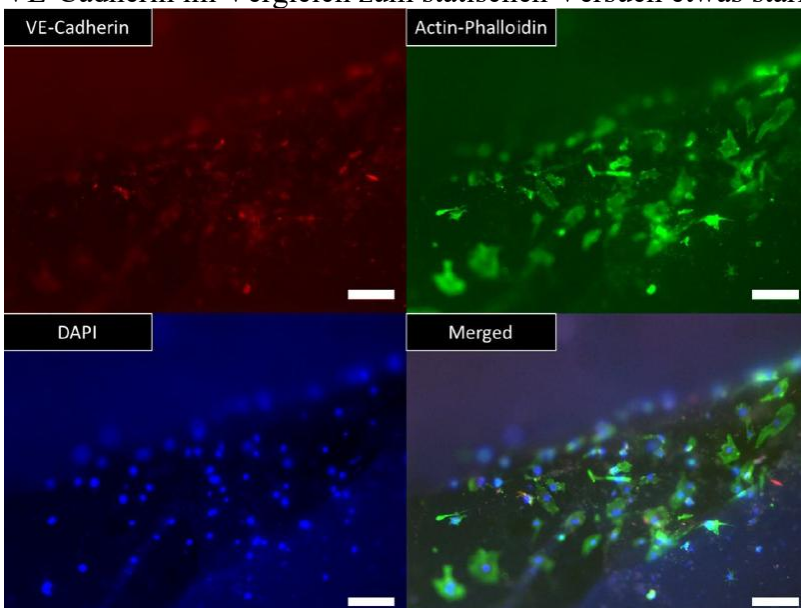


Abbildung 57: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von eingefärbten HUVECs (rot für VE-Cadherin, grün für Actin-Phalloidin und blau für DAPI). Die Zellen wurden mit PFA fixiert, nachdem sie 14 Tage lang mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,08 mL/min dynamisch im Bioreaktor kultiviert worden waren. Skalenbalken entsprechen 200 µm.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation wurden *In-vitro*-Gewebe-Modelle mittels 3D-Biodruckverfahren entwickelt, die innerhalb eines Bioreaktors über mehrere Tage hinweg dynamisch kultiviert werden konnten. Dabei lag der Fokus dieser Arbeit auf einem Blutgefäßersatzmodell, das zum einen durch integrierte Tumorsphäroide und zum anderen durch ein Leber-Modell erweitert wurde. In nachfolgenden Studien sollten diese beiden Modelle miteinander kombiniert werden. Die beiden *In-vitro*-Modelle sollten die *In-vivo*-Situation dabei bestmöglich nachbilden, um damit im Nachgang (patho-) physiologisch relevante Erkenntnisse aus diesen ziehen zu können. Zunächst wird dazu im Folgenden näher auf die Gestaltung des Modelles und des Bioreaktors eingegangen. Dazu werden Vor- und Nachteile der entwickelten Modelle im Vergleich zu Chipmodellen erörtert. Ebenfalls wird die Wahl der Hydrogele und ihre Eigenschaften diskutiert, denn deren Steifigkeit sowie Relaxationsverhalten, aber auch die Architektur der Fibrillen, sowie die Zell-Matrix Interaktionen und Veränderungen über die Versuchszeit spielten eine wichtige Rolle [47]. Weiter wird auf die Zusammensetzung sowie die Anzahl der Zellen eingegangen. Ein weiterer wichtiger Aspekt in dieser Arbeit war die dynamische Kultivierung. Die mit dem hierfür entwickelten Versuchsprotokoll erzielten Durchflussgeschwindigkeiten und Scherspannungen wurden mit Daten aus publizierten Modellen anderer verglichen.

Biorektor und Kanal Design

Zunächst wurde ein geeigneter Bioreaktor entworfen. Im Vergleich zu üblichen Chip-Modellen, sollte dieser einen größeren Innenraum besitzen, um eine komplexere Makrostruktur des Gefäßersatzes umsetzen zu können. Die Erweiterung von üblichen 2D-Kulturen zur Medikamententestung sind Chipmodelle. Diese legen den Fokus darauf, die Hauptfunktionsmerkmale eines bestimmten Gewebes oder Organs mikroskalig nachzubilden. Dabei werden entsprechende Zellen einer Mikroumgebung ausgesetzt, die für die Funktion des (patho-) physiologischen Zustandes eine Rolle spielen. Daran anlehnend wurde das Design dieser Arbeit gewählt, die Hauptfunktionen und Parameter des (patho-) physiologischen Zustandes nachzuempfinden. Dabei wurden nicht nur mikroskopische Einflüsse, sondern auch makroskopische nachgebildet, um die *In-vivo*-Situation noch besser abzubilden. Durch Parameter wie Zellzusammensetzung, Gewebeanordnung, Materialwahl, aber auch das Einbringen von physiologisch relevanten Blutgefäßmodellen konnten unterschiedliche Interaktionen abgebildet und analysiert werden. Dazu gehört zum einen die Wahl der Hydrogele, die für jedes spezifische Gewebe angepasst wurden, wobei z. B. die Porengröße und Steifigkeit eine wichtige Rolle spielten. Zum anderen aber auch der Einfluss von Scherbeanspruchungen, die wichtig für die Ausbildung einer stabilen Endothelschicht der Gefäßwände waren. Oder aber die Interaktionen von umgebender Matrix und Zellen eines Tumorsphäroids, die unter dynamischer Kultivierung dazu führten, dass sich Mikrogefäße ausbildeten und Metastasen im Medium gefunden werden konnten. Durch den großen Innenraum des Bioreaktors, sowie der Gestaltung der Modelle, können mehr Parameter für bestimmte Abläufe, wie zum Beispiel der Ausbildung von Metastasen, studiert werden, im Vergleich zu kleineren Chip-Modellen. Der Vorteil von Chip-Modellen liegt in ihrer Vereinfachung von komplexen Systemen, die mit einem hohen Durchsatz, wenig Materialverbrauch und guter Reproduzierbarkeit sehr gut für präklinische *In-vitro*-Testung von Medikamenten geeignet sind [46]. Jadalannagari und Erwart bemängeln, dass die Diversität unterschiedlicher Gewebe in der Organisation beachtet werden müsse, da diese zum Beispiel die Sauerstoff- und Nährstoffverteilung, sowie die interzelluläre Kommunikation, ebenso wie den Austausch z.B. mit Gefäßen, beeinflusst [46]. Die in dieser Arbeit gedruckten, verzweigten

Blutgefäße in der Größenordnung von 500-1000 μm wurden durch Hydrogele gebildet und sind nicht wie in den Chip-Modellen durch oftmals quadratisch eingebrachte Kanäle in Materialien wie Glas, Plastiken wie Polystyrol (PS) oder PDMS [55]. Ein Beispiel dafür ist der kommerziell erwerbliche Chip Emulate. Ewart et al. testeten 2022 in einer Studie den Emulate Leber-Chip mit 27 toxischen und nicht-toxischen Komponenten. Das Resultat war eine Sensitivität von 87 % und eine Spezifität von 100 %. Der Chip enthielt primäre Hepatozyten, die in Matrigel eingebettet wurden, sowie leber-sinusoidale Endothelzellen, Kupfferzellen und Sternzellen enthielt. Der Chip selbst bestand aus zwei Kanälen, die durch eine poröse Polymermembran voneinander getrennt wurden und die jeweiligen Zellen auf den jeweiligen Seiten enthielt. Die Kanäle sowie das Chip-Grundgerüst bestanden aus PDMS. Insbesondere Ewart et al. und Jadalannagari et al. sehen die Verwendung von PDMS für In-vitro-Modelle kritisch, da das Material kleine hydrophobe Moleküle aufnehmen kann und somit aufgrund der Absorption von Medikamenten oder ausgeschütteten Molekülen Ergebnisse verfälschen kann [46], [29]. Toepke und Beebe analysierten 2006 die Absorption von kleinen hydrophoben Molekülen in PDMS. Dabei zeigten sie, dass ein hydrophobes Fluorophore mit dem Molekulargewicht von 318 g/mol bereits nach einer Minute Inkubation vom PDMS absorbiert wurde [107]. Als alternative Materialien eignen sich neben dem Polymer PEEK, Hydrogele und Glas [19]. Genau diese Materialien wurden in dem in dieser Arbeit beschriebenen Bioreaktor verwendet. Zellen mussten ausschließlich mit Hydrogelen interagieren, die auch in der natürlichen Umgebung, der extrazellulären Matrix, vorkommen, wodurch die *In-vivo*-Situation sehr gut nachgestellt wurde. Ebenfalls wurde in dieser Arbeit der Fokus auf die Organisation und Anordnung des natürlichen Gewebes gelegt. Auch wenn die Vereinfachung der physiologischen Funktion sowie deren Aufbau es ermöglichen, vor allem standardisierte Modelle zu entwickeln, die für die Testung von Medikamenten benötigt werden, können makro- und mikroskalige Modelle in Kombination neue Erkenntnisse für Wechselwirkungen von Medikamenten mit Zellen, Barrieren durch Endothelschichten und umgebender Matrix liefern. Das Modelldesign in der vorliegenden Arbeit fokussierte sich darauf, die Analyse von unterschiedlichen Wechselwirkungen und Abläufen in der Zukunft möglich zu machen. Dazu wurden Zellen dreidimensional in natürliche EZM Komponenten eingebettet und mechanischen Stimuli ausgesetzt.

Endothelzellen bilden Mikrogefäße aus, wenn dafür eine Notwendigkeit besteht. Dies ist z. B. durch eine unzureichende Konzentration an Sauerstoff oder Nährstoffen oder durch mechanische Reize von außen gegeben. In der vorliegenden Arbeit wurde dies im Design beachtet. Die Idee, zwei parallel unabhängig voneinander verlaufende Gefäße zu haben, führte dazu, dass das Bioreaktor-Design zwei Einlässe bzw. Auslässe besitzt, an die zwei unterschiedliche Reservoirs angeschlossen werden können, die zum einen mit unterschiedlichen Durchflussgeschwindigkeiten betrieben, aber auch mit unterschiedlichen Medien (Gradienten Aufbau von Wachstumsfaktoren) oder auch in unterschiedlichen Höhen gelagert werden können (Druckgradienten Aufbau innerhalb des Gewebes). Durch den größeren Bauraum des Bioreaktors im Vergleich zu Chip-Modellen konnten die Abstände der Blutgefäße größer gewählt werden. So betrug der Abstand der parallel verlaufenden Gefäße 6,5 mm oder innerhalb des Doppelkanals 2,5 mm. Die Länge der Gefäße und somit der Raum, in dem die Durchströmung des Mediums mit der Umgebung interagiert, betrug 28 mm. Ebenfalls konnten Tumorsphäroide in einem größeren Abstand zum Gefäß und somit in einem größeren Abstand zum Versorgungsmedium platziert werden. Chip-Modelle hingegen werden häufig so gestaltet, dass das Gewebemodell innerhalb eines Wells einer 96er Wellplatte passt. Dieses besitzt einen Durchmesser von nur ca. 6,9 mm, wobei dabei die Kanäle ebenfalls innerhalb dieses Wells beobachtet werden können. So beschränkt sich die Größe dieser Gewebe auf 100 μm und selten auf einige wenige Millimeter. Fortgeschrittenere Chip-Modelle schließen die Ausbildung von Mikrogefäße für vaskularisierte Gewebemodelle mit ein. Lemmens et al.

weisen in ihrem Übersichtsartikel auf die Wichtigkeit des gesamten Zusammenspiels von extrazellulärer Matrix und Perfusion aber auch das Einbringen von Endothelzellen zur Ausbildung eines vaskulären Bettes, das sich unter dem Einfluss der Scherbeanspruchung entwickelt [54]. Hughes et al., verwendeten für unterschiedliche vaskularisierte Modelle den Chip von Aracari Biosciences. Dieser besteht ebenfalls aus PDMS und enthält ein komplexes Kammern- und Kanal-System das dazu dient, vaskularisiertes Gewebe zwischen zwei Kanälen zu erschaffen, in dem unterschiedliche Durchflussgeschwindigkeiten der beiden Kanäle erzeugt wird (Simulation der arteriellen und venösen Durchflussraten). Zwischen den Kanälen befinden sich eingebettete, gewebeentsprechende Zellen zusammen mit Endothelzellen, die in einer Fibrin-Matrix eingebettet sind. Besonders an diesem Chip ist, dass dieser perfekt für das Format einer 96er-Wellplatte ausgelegt ist und sich hervorragend für die mikroskopische Analyse eignet. Die integrierten Reservoirs eignen sich dazu, durch passive gravitationsangetriebene Perfusion, Scherbeanspruchungen in das Modell einzubringen. Dazu werden die Reservoirs unterschiedlich hoch befüllt. Dabei kommt es bereits nach wenigen Tagen zur Ausbildung eines vaskulären Bettes innerhalb des Gewebes. Nachteil dieser Methodiken sind, dass das Medium zum einen alle 24 Stunden gewechselt werden muss. Des Weiteren ist die Durchflussgeschwindigkeit heterogen und nicht vollständig beeinflussbar [30], [101]. Das Modell in der vorliegenden Arbeit hat die Vorteile ähnlicher Chipmodelle genutzt und Schwachstellen ausgebessert. Die Reservoirs haben ein größeres Fassungsvermögen, wodurch der Medien austausch nicht alle 24 Stunden geschehen musste. Nachteil des größeren Fassungsvermögens an Medium ist die Verdünnung von zu messenden ausgeschütteten Faktoren, die Aufschluss über die Entwicklung des Modells hätten liefern können. Dies zeigte sich auch in der Analyse der Albumin Produktion, die von den Leberzellen an das Medium abgegeben wurden. Die Konzentrationen waren zu gering, um sie mittels Elisa detektieren zu können. Um eine homogene Perfusion zu gewährleisten, wurden diese mittels peristaltischer Pumpe gesteuert, wodurch die Scherraten über den Kultivierungszeitraum gleich blieben und genau kontrolliert oder beeinflusst werden konnten. Durch die Anpassung des Bioreaktors zeigte sich in der Simulation, dass lediglich in direkter Nähe der Ein- bzw. Auslässe die Scherspannungen minimal von der mittleren Scherbeanspruchung abwichen, ansonsten aber in den Kanälen oder aber über die Gesamtfläche konstant waren, ohne turbulente Geschwindigkeitsprofile zu erhalten.

Die dreidimensionale Gestaltung sollte im vorliegenden Modell möglich sein. Chip-Modelle haben den Nachteil, dass die Modelle aufgrund ihrer Fabrikationstechnik planar sind und somit weniger Komplexität zulassen. Der Bauraum in dieser Arbeit ermöglichte einen höheren Freiheitsgrad an Möglichkeiten, die Modelle zu gestalten. Einziger Nachteil in einer dreidimensionalen Gestaltung innerhalb dieses Bauraums könnte die Auflösung der Mikroskopie mit sich bringen, da lediglich nur die Strukturen in unmittelbarer Nähe zum Bodendeckglas direkt mikroskopiert werden konnten, ohne dabei in das Gewebe direkt einzugreifen. Jedoch zeigte sich, dass die Materialwahl von PEEK zuließ, dass z. B. die vaskulären Strukturen auch mittels hochauflösendem CT untersucht werden konnten. Dadurch konnten auch tiefergehende dreidimensionale Bilder ermöglicht werden, ohne dabei eventuelle sensitive Mikrostrukturen zu zerstören [25]. Zudem war es im Vergleich zu üblichen Chip-Modellen möglich, das gesamte Gewebe innerhalb des Bioreaktors zu entnehmen und z. B. durch Kryoschnitte und anschließender Immuneinfärbung zu untersuchen. Diesen Vorteil bieten Chip-Modelle nicht, wodurch man auf die direkte Bildgebung und Analyse von Faktoren in Medium beschränkt ist. Ebenfalls können Chip-Systeme, die aufwendig hergestellt werden müssen, nur einmalig verwendet werden. Die Konstruktion des hier genannten Bioreaktors ermöglicht es, durch das Auseinanderbauen vollständige Reinigen und Autoklavieren mehrfach verwendet zu werden.

In-vitro-Modelle

Duport et al. untersuchten die mechano-biologischen Einflüsse auf Zellen die z. B. durch die umgebende Matrix oder durch Perfusion gegeben werden [96] [91]. So geht aus mehreren Studien hervor, dass die mechanischen Eigenschaften und die Architektur der umgebenden Matrix die Differenzierung, Migration und Proliferation von Zellen beeinflussen.

In dieser Arbeit wurden natürliche Hydrogele verwendet. Synthetische Hydrogel erfordern eine genaue Charakterisierung und oftmals auch Funktionalisierung, um mit Zellen interagieren zu können [44]. Dies gilt nicht für die meisten natürlichen Hydrogele, die von Natur aus biokompatibel sind, gute Zellbindung, Proliferation und Zellspreizung gewährleisten, dazu bioaktive Stimuli steuern und von den Zellen erkannt und umodelliert werden und die gleichzeitige Ablagerung von zellsekretierter EZM ermöglichen [37], [21]. Ebenfalls ist die fibrillare Struktur von natürlichen Hydrogelen relevant [47]. Die Wahl von Kollagen, Fibrin oder Mischungen als Hydrogel in dieser Arbeit zu verwenden beruht darauf, dass diese bereits in Studien ihre besondere Eignung gezeigt haben und auch in der natürlichen Matrix im Körper vorkommen [44] [37]. Juliar et al. untersuchten in einem Experiment mit in Fibrin (2,5 mg/mL) eingebetteten Fibroblasten und Microbeads, die mit Endothelzellen beschichtet wurden, wie sich die Steifigkeit der Fibrinmatrix über einen Kultivierungszeitraum von 14 Tagen änderte. Dabei fiel ihnen auf, dass bereits nach kurzer Zeit die Fibrinmatrix um die eingebetteten Fibroblasten eine andere Steifigkeit aber vor allem chaotischere Struktur aufwies, was dafür sprach, dass die Fibrinmatrix von den Fibroblasten umodelliert wurde [47]. Im 3D-Biodruck werden auch andere natürliche Hydrogele vor allem aufgrund ihrer besonderen mechanischen Eigenschaften gewählt. Dazu gehören zum Beispiel Alginate und Agarose, die sich besonders leicht verarbeiten und vor allem gut kontrolliert gelieren lassen. Jedoch sind diese Materialien bioinert, so dass Zellen nicht mit dem Material (ohne Funktionalisierung) interagieren können [43]. Anders sieht es bei Kollagen und Fibrin aus. Diese weisen besonders gute Zelleigenschaften auf. Zellen können gut anhaften, mit der Matrix agieren und diese abbauen bzw. umstrukturieren. Die Charakterisierung der Hydrogele, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, zeigte, dass durch die Kombination von Kollagen und Fibrin die Eigenschaften der Hydrogele gut eingestellt werden konnten. So wurde durch die Zugabe von Fibrin das mechanisch schwache Kollagen stabilisiert (Abbildung 16). Dies führte ebenfalls dazu, dass der Wasserverlust deutlich verringert wurde (Abbildung 17). Deutlicher Wasserverlust kann vor allem bei der dynamischen Kultivierung schnell dazu führen, dass das Gewebemodell einen Wasserfilm zwischen dem Hydrogel und dem Bioreaktor bildet, wodurch dieses Modell schnell kollabieren und es zum Verlust des Gewebemodells kommen würde. Durch die Anpassung der Hydrogele, waren diese über einen Zeitraum von mindestens 21 Tagen dynamischer Kultivierung stabil. Ebenfalls konnte die Porengröße des Fibrins durch die Zugabe von Kollagen vergrößert werden, was sich als positiv für unterschiedliche Gewebe-Modelle erwies (Abbildung 21 und Abbildung 22).

Vaskularisierte Gewebemodelle generell

Aufgrund des gewählten Durchmessers von 500 bis 1000 µm der gedruckten vaskulären Strukturen handelte es sich dabei um die Größenordnung von Arterien bzw. Venen. Diese sollten, wenn es einzig um die Nachbildung eines naturgetreuen Blutgefäßes geht, einen komplexen zellulären Aufbau besitzen und somit z. B. auch Glattmuskelzellen enthalten. Jedoch dienten diese in den Versuchen der hier beschriebenen Arbeit vor allem der Versorgung und der Barriere-Funktion durch die Endothelzellen. Weitere Zellschichten wären in den zuvor genannten Modellen und für die hier durchgeführten Versuche zu komplex gewesen, um das

System zu optimieren. So wurden zum Beispiel Versuche für die richtige Wahl des Mediums im Bezug auf Endothelzellen und Hepatozyten durchgeführt und auch nur deren Medien in Betracht gezogen. Dabei zeigte sich, dass das Zusammenspiel der Zellen einen Einfluss auf die Wahl des Mediums hatte. Das Einbringen von Glattmuskelzellen würde ebenfalls diese Wahl beeinflussen und müsste in weiteren Versuchen analysiert werden. Die Erweiterung durch Glattmuskelzellen sollte für die Weiterverwendung der Modelle jedoch beachtet werden und könnte nach Vollendung der Optimierung der Gewebemodelle einen deutlichen Vorteil mit sich bringen, um das gewünschte Gewebe noch besser nachzubilden.

Die Gefäßstrukturen wurden mittels Extrusions-3D-Biodruck in den Bioreaktor eingebracht. Vor allem das Hydrogel Pluronic ist dafür bekannt, dass es gute Eigenschaften für den 3D-Extrusionsdruck aufweist. Auch die Ergebnisse in Kapitel 4.7.2 Doppel-Opfer-Material Methode zeigte die hohe Präzision und einfache Handhabung bei der Verwendung von Pluronic. Jedoch konnte zum einen bestätigt werden, dass Pluronic bioinert ist und ebenfalls, dass es schwierig war, dieses vollständig auszuwaschen. Dies zeigte sich indem die HUVECs nach dem Einspülen in die Hohlstruktur kaum bis gar nicht an der umgebenden Matrix anhafteten. Auch nach mehrmaligem Waschen mit PBS oder sogar dem anschließendem Benetzen mit Laminin, wurde keine Verbesserung nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass kleinste Mengen an Pluronic an der umgebenden Matrix zurückblieben und dadurch verhinderten, dass die HUVECs stabil anhaften konnten [43]. Diese bioinerten Eigenschaften konnten ebenfalls von Higuchi und Kollegen beobachtet werden, wobei sie diesen Vorteil nutzten, um Zellkulturflaschen mit Pluronic zu beschichten, damit hämatopoetische Stammzellen konserviert werden konnten. Ebenfalls zeigte sich, dass Fibroblasten sich nicht ausstreckten, sondern in einer runden Form blieben, was auf die bioinerte Umgebung hinwies [41]. Pluronic besitzt thermoreversible Eigenschaften, die genau umgekehrt wie die von Gelatine wirken. Daher werden komplexere Strukturen oftmals mit Pluronic gedruckt. Auch in den hier durchgeführten Versuchen war die Überbelegung, Pluronic zu nutzen, da es über lange Zeit bei Raumtemperatur stabil ist. Die umgebende Matrix (Kollagen-Fibrin) hätte zunächst vollständig gelieren können, bevor der Bioreaktor in den Kühlschrank gestellt wurden wären, um das Pluronic bei niedrigen Temperaturen zu verflüssigen und im Anschluss auszuwaschen. Die Nachteile des Pluronic konnten durch die Wahl von Gelatine umgangen werden. Zellen hafteten sehr gut an der umliegenden Matrix an, was daran lag, dass Gelatine aufgrund der enthaltenen RGD-Sequenzen nicht bioinert ist und Zellen mit der umgebenen Matrix interagieren können [37]. Die Verwendung von Gelatine brachte ebenfalls den Vorteil, dass die HUVECs direkt in das Opfermaterial eingebracht werden konnten, wodurch der Herstellungsprozess verkürzt wurde. Dies wäre mit Pluronic nicht möglich gewesen, dass die Zellen in das stark heruntergekühlte Pluronic eingemischt hätten werden müssen, was zu einem Schock und vermutlich Verringerung der Zellviabilität geführt hätte. In der Gelatine eingebettet, überlebten die Zellen auch die kurzzeitig langsame Kühlung (Abbildung 29) ohne an Viabilität zu verlieren. Unterschiedliche Gelatine- und Zellkonzentrationen wurden experimentell miteinander verglichen. Ebenfalls wurde der Herstellungsprozess der Biotinte optimiert, um anschließend im 3D-Biodruck-Verfahren stabile Kanäle drucken zu können, die mit gesunden Endothelzellen ausgekleidet waren.

Die Steifigkeit der umgebenden EZM spielt ebenfalls bei der Ausbildung von Mikrostrukturen eine wichtige Rolle [47]. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigten, dass unter anderem die VE-Cadherin Verbindungen von Endothelzellen ausgeprägter in dem eher steiferen Kollagen-Fibrin Hydrogel im Vergleich zum weniger steifen Gemisch war (Abbildung 25). Dies könnte darauf hinweisen, dass Endothelzellen ein ausreichend stabiles Grundgerüst benötigen, um miteinander stabile Verbindungen auszubilden. Der Feststoffgehalt in dem steiferen Hydrogel war höher und die Porengröße geringer, wodurch Zellen vermutlich leichter in Zell-

Zell Kontakt treten können und die steifere Matrix den benötigten mechanischen Stimuli widerspiegelt, damit Zellen untereinander Verbindungen ausbauen. Kniazeva et al. untersuchte dazu die Verschiebung von Fibrinfasern, die durch die Kraft der Zellen bei der Ausbildung der Mikrogefäße von Endothelzellen stattfanden. Dabei zeigte sich, dass neben der Zunahme der Steifigkeit um die gebildeten Strukturen, auch die Verschiebung der Fasern zunahm. Weiter untersuchten sie den Einfluss der Dichte der Matrix, durch die Veränderung der Fibrinkonzentration, die mit der Anfangssteifigkeit der Matrix zusammenhängt. Es zeigte sich, dass eine zu geringe Konzentration an Fibrin zu weniger Angiogenese führte, dies galt für eine Konzentration von 1 mg/mL Fibrin. Angiogenese stieg bis zu einer Konzentrationserhöhung von 2,5 mg/mL an und nahm dann aber stetig mit einer Konzentrationserhöhung von 10 mg/mL erneut ab. Die Verschiebung durch die Endothelzellen der Fibrinfasern nahm ebenfalls zunächst mit der steigenden Konzentration an Fibrin bis zu 2,5 mg/mL zu, nahm aber anschließend ebenfalls mit einer Anhebung der Konzentration ab, was die Korrelation der Verschiebung zur Ausbildung von Angiogenese zeigte [49]. Die Konzentrationen an Fibrin in den Hydrogelen der vorliegenden Arbeit waren in den Kollagenkompositionen zwischen 4,4 mg/mL und 7,8 mg/mL. Jedoch zeigte sich, dass durch die Zugabe von Kollagen die Porengröße anstieg, im Vergleich zu reinem Fibrin. Auch der Vergleich der REM-Aufnahmen der Studie und der Hydrogele in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Faserstruktur eher der des Kollagens entsprach, anstelle des reines Fibrins. Dies könnte den Vorteil gebracht haben, dass die Zellen sich untereinander leichter finden konnten und trotzdem leichter die Fasern entweder Verschieben konnten oder sich durch die Poren bewegen konnten um andere Zellen zu finden. Ebenfalls können die Werte des Kompressionsversuchs mit Werten der Gruppe aus zuvor veröffentlichten Werten verglichen werden. Dabei entsprach die Komposition mit dem geringeren Fibrin Wert (4,5 kPa) in etwa dem des Fibrins mit 5 mg/mL mit 4,06 kPa [33]. Dies könnte ebenfalls von Vorteil für die Endothelzellen gewesen sein, in der hier beschrieben Arbeit, um sich trotzdem innerhalb des Hydrogeles ausbreiten zu können, um vaskuläre Strukturen auszubilden. Die dichte Struktur des reinen Fibrins könnte ebenfalls dazu beigetragen haben, dass darauf besiedelte Endothelzellen eher dazu neigen eine einzelne Schicht auszubilden, anstelle in das Hydrogel hineinzuwachsen, was dazu geführt hätte, dass die Gefäßwand zu porös wäre und keine Barrierefunktion mehr vorhanden gewesen wäre. Was sich in dem Vergleich der Beschichtung der unterschiedlichen Hydrogele mit Endothelzellen zeigte. Die Endothelschicht war glatter und dichter auf dem reinem Fibrinhydrogel, im Vergleich zur Mischung von Fibrin und Kollagen. In der Doktorarbeit von Dreyer wurden REM-Bilder einer dezellularisierten Rattenaorta und elektrogesponnenen Gefäßprothese verglichen. Es zeigte sich, dass die Porengrößen der natürlichen Aorta deutlich kleiner als die der Gefäßprothesen waren [28]. Vergleicht man die Porengrößen der Aorta, mit den REM-Bildern in der vorliegenden Arbeit des Fibrin Hydrogels, sind diese in der gleichen Größenordnung. Gleiches gilt für den Vergleich von dezellularisierten bovinen Blutgefäßen [74]. Dies erklärt, warum die Endothelzellen vor allem das reine Fibrinhydrogel bevorzugten, um eine glatte stabile Endothelschicht auszubilden.

Fibroblasten spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Angiogenese, da sie angiogene Faktoren ausschütten und perizytenartig dazu beitragen, dass Endothelzellen tubuläre Strukturen ausbilden [47]. Der positive Einfluss von Fibroblasten konnte auch in der vorliegenden Arbeit, vor allem für das geringer konzentrierte Hydrogel festgestellt werden. So zeigte sich, dass Endothelzellen nach drei Tagen Kultivierung besser anhafteten und deutlich stärkere VE-Cadherin Verbindungen ausbildeten, im Vergleich ohne eingebrachte Fibroblasten. Das Einbinden von Perizyten in einem zukünftigen Modell könnte die Ausbildung von tubulären Strukturen der Endothelzellen unterstützen. Der positive Effekt von mesenchymalen Zellen wurde auch von Juliar und Kollegen gezeigt, indem sie Endothelzellen auf Microbeads kultivierten und diese in eine Fibrin-Matrix (2,5 mg/mL) einbetteten.

Fibroblasten wurden entweder in das Hydrogel mit eingemischt oder auf dem Hydrogel als Schicht kultiviert. Nach 14 Tagen zeigte sich für beide Konditionen, dass sich die Endothelzellen deutlich zu Mikrogefäßen von den Microbeads weg ausbildeten. Ebenfalls zeigte sich in dieser Studie, wie oben beschrieben, dass die Fibroblasten dazu beitragen, dass die Matrix umstrukturiert wurde, wodurch sich die Steifigkeit und die Struktur partiell änderte. Die Erhöhung der Steifigkeit mit Zunahme in den Regionen, in denen sich mikrotubuläre Strukturen ausbildeten verdeutlicht, dass die Endothelzellen zu einer höheren Steifigkeit beitragen, um Strukturen ausbilden zu können und dass diese durch das Hinzugeben von Fibroblasten unterstützt wurden [47].

Es ist bekannt, dass mechanische Stimuli in Form von Scherbeanspruchungen wichtig für Endothelzellen sind, um eine stabile Zellschicht auszubilden. Bereits 1984 veröffentlichten Dewey et al. die morphologische Veränderung von Endothelzellen, die nach statischer Kultivierung für 72 Stunden einer Scherbeanspruchung von 8 dyn/cm² ausgesetzt wurden [26]. Aus diesem Grund, wurden die Endothelzellen in der vorliegenden Arbeit unterschiedlichen Scherbeanspruchungen ausgesetzt, indem die aus Vorarbeiten von Schöneberg et al. [99] genutzte Durchflussgeschwindigkeit auf das Experiment, bzw. die vergrößerte Fläche angepasst wurde. Dazu wurden die Zellen nach unterschiedlicher, zuvor durchgeführter statischer Kultivierung einem Durchfluss von 0,4 mL/min für 24 Stunden und weiteren 24 Stunden mit 0,8 mL/min ausgesetzt und die Scherbeanspruchung zuvor simuliert. Die durchschnittlichen Werte lagen dabei für 0,4 mL/min bei 0,001 Pa, dies entspricht 0,01 dyn/cm². Für einen Durchfluss mit 0,8 mL/min entspricht die durchschnittliche Scherbeanspruchung 0,002 Pa, also 0,02 dyn/cm². Diese Werte liegen deutlich unterhalb der physiologischen Scherbeanspruchung, die für Venen bei 1 bis 6 dyn/cm² liegt und für Atrien sogar bei 10–70 dyn/cm² [79]. Sun und Kollegen untersuchten den Einfluss von Scherbeanspruchungen auf die Ausrichtung von Endothelzellen. Nach bereits sechs Stunden dynamischer Kultivierung mit 5 dyn/cm² orientierten sich die HUVECs Zellen bereits entlang der Durchflussrichtung. Ebenfalls streckten die Zellen sich. Die morphologische Veränderung war zeitlich weiter zu beobachten, bis dieser Prozess sich nach 18 Stunden stabilisierte. Für hohe Scherbeanspruchungen zeigte sich eine geordnete Ausrichtung, während diese eher chaotischer für die geringere Beanspruchung war [102]. Da in der vorliegenden Arbeit die Scherspannungswerte deutlich geringer waren, kann diese Beobachtung nicht bestätigt werden. Sogar mit der hier genannten geringen Scherbeanspruchung orientierten die Zellen sich deutlich entlang des Durchflusses. Jedoch zeigte sich dieser Effekt vor allem für die Zellen, die bereits eine vollständige Endothelschicht statisch nach 72 Stunden ausgebildet hatten. Zum Zeitpunkt 0 (72 Stunden statisch vor dynamischer Kultivierung), zeigten die Zellen bereits eine deutlichere Streckung im Vergleich zu den Proben nach drei oder 24 Stunden statischer Kultivierung. Nach 24 Stunden dynamischer Kultivierung mit 0,4 mL/min, zeigten die Zellen eine starke Neuausrichtung entlang des Durchflusses, die weniger bis gar nicht in den Proben mit 24 Stunden statischer Kultivierung beobachtet werden konnte. Eine weitere stärkere Ausrichtung der Zellen konnte vor allem nach weiteren 24 Stunden mit einer erhöhten Durchflussgeschwindigkeit für die 72 Stunden-Probe festgestellt werden. Im Vergleich zur Studie von Sun, könnte dies an der erhöhten Scherbeanspruchung aber auch an der Zeit unter Scherbeanspruchung liegen. Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene Experiment könnte darauf hinweisen, dass es ebenfalls von Vorteil ist, die Zellen zunächst statisch zu kultivieren, bevor sie Scherbeanspruchungen ausgesetzt werden, um sich im Anschluss unter dynamischer Kultivierung besser ausrichten zu können. Diesen Aspekt benutzen auch Arslan et al., die den Einfluss von turbulenten Strömungen auf die Ausrichtung von Endothelzellen analysiert haben. Dazu kultivierten sie zunächst HUVECs auf Glas für zwei bis drei Tage, bis die Zellen eine konfluente Schicht ausgebildet hatten, bevor sie die dynamische Kultivierung starteten [5]. Durch die Einfärbung von VE-Cadherin zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit, dass die

Zell-Zell Verbindungen noch nicht vollständig ausgebildet waren, was sich an Tag drei der statischen Kultivierung stark besserte. Für die hohe Komposition von Kollagen und Fibrin wurden die VE-Cadherin-Verbindungen durchgehender und für die reine Fibrinprobe vor allem deutlich ausgeprägter auch im direkten Vergleich. Dies spricht erneut dafür, dass eine statische Kultivierung von Endothelzellen vor der dynamischen Kultivierung von drei Tagen von Vorteil ist.

Lebermodelle

Es ist bekannt, dass Hepatozyten vor allem in dreidimensionalen Strukturen am besten kultiviert werden können, ohne dabei ihre Funktion zu verlieren oder ihre Morphologie zu verändern [65]. HepG2 Zellen wurden in den hier verwendeten Versuchen in ein geeignetes Hydrogel dreidimensional eingebettet, die der Steifigkeit mit 4,5 kPa, der der gesunden Leber entsprach. Diese wurde mit einer steiferen Komposition verglichen, die eine Steifigkeit von 15 kPa, und somit eher einer pathologisch veränderten Leber entspricht. Die Messung der Steifigkeit der Leber wird dazu verwendet, um pathologische Veränderungen zu diagnostizieren. Steigende Werte können zum Beispiel auf eine Leberentzündung, sowie Leberfibrose oder -zirrhose hinweisen. Werte über 8 kPa entsprechen den anfänglichen Grenzwerten für eine Veränderung der Leber, wobei Werte unter 6 kPa als normal bzw. 4,4 kPa als durchschnittlicher gesunder Wert für Lebersteifigkeit bemessen wird [70]. Durch eine Entzündung der Leber kommt es zur Aktivierung der Lebersternzellen, welche dadurch extrazelluläre Matrix, insbesondere Kollagen I, produzieren. Dabei kann es bis zu einem zehnfachen Anstieg an Feststoffgehalt der Matrix kommen [31], [75]. Die in dieser Arbeit verglichenen Hydrogelkomposition unterschieden sich in ihrem Feststoffgehalt an extrazellulärer Matrix, um den Faktor 2,2. Lang et al. verglich die Albumin Produktion von Hepatozyten die entweder auf einem Polymersubstrat, in Sandwichkultur oder dreidimensional in einem EZM-Gerüst kultiviert wurden. Die Analyse zeigte eine ansteigende metabolische Aktivität und somit den höchsten Albuminwert im 3D-Gerüst [52]. Ruoß et al. versuchten nachzuweisen, dass es wichtig ist, die natürliche Matrix für In-vitro Modelle der Leber bestmöglich nachzubauen, da die mechanischen Stimuli der umgebenden Matrix auf die Zellen grundlegende Einflüsse auf das Zellverhalten und somit auf das Modellverhalten hat. Dazu charakterisierten sie zwei unterschiedliche Matrices, um ein Modell für eine gesunde Leber sowie für eine pathologisch veränderte Leber zu erhalten. Diese verglichen sie mit Werten und mikroskopischen Bildern von gesundem sowie erkranktem Lebergewebe. Als repräsentative Matrix für die gesunde Leber wählten sie die Matrix mit einer geringeren Steifigkeit, die im Bereich der gesunden Leber liegt, während die Matrix mit einer höheren Steifigkeit (um die 20 kPa) für das Modell der pathologisch veränderten Leber gewählt wurde. Zusätzlich wurden Porengrößen verglichen. Die REM-Bilder der Lebergewebsproben zeigten, dass die gesunde Leber offene Poren mit dünnwandigen Strukturen besitzt [92]. Beim Vergleich der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kompositionen zeigte sich, dass mit steigendem Fibringehalt nicht nur die Steifigkeit stieg, sondern auch die Porengröße deutlich abnahm, wodurch erneut die geringer konzentrierte Komposition die bessere Wahl für das Lebermodell war. Dies zeigte sich auch in der erhöhten Produktion von Albumin und MRP2 in der geringer steifen Matrix. Das Abnehmen der Produktion an leberspezifischen Proteinen mit zunehmender Steifigkeit der Matrix, zeigt dass die Hepatozyten, unabhängig von der Ko- oder Tri-Kultur deutlich die weichere Matrix bevorzugten und ihr Metabolismus stärker in der gesunden Leber imitierenden Matrix war. In einer weiteren Studie von Xia et al. wurde der Einfluss der Steifigkeit der umgebenden Matrix auf die Migration und Funktion von Hepatozyten untersucht. Dazu wählten sie drei unterschiedliche Steifigkeiten zwischen 4,8 kPa, repräsentativ für die gesunde Leber, 21 kPa für das Frühstadium der Leberfibrose und 45 kPa für deren Endstadium. So zeigte sich, dass steifere Substrate den Phänotypen der Hepatozyten veränderte und Apoptose verursachte. So

nahm die Albuminproduktion mit der Zunahme der Steifigkeit deutlich ab [114]. Diese Werte bestätigen, die Wichtigkeit der Wahl des Hydrogels. Es belegt, dass die metabolische Aktivität von Hepatozyten, eingebettet in einen Matrixersatz mit einer Steifigkeit vergleichbar der von gesundem Lebergewebe, am höchsten ist. In dem zuvor genannten Paper nahm die Migration der Hepatozyten mit der Steifigkeit zu. Kleine Zellausstülpungen konnten auf der Matrix mit der größten Steifigkeit beobachtet werden. Die Zellen wurden in dem zitierten Paper als rundlich beschrieben und auf den Bildern dieser Publikationen ist zu sehen, dass diese keine Kolonien ausbildeten, wie es für Hepatozyten eigentlich üblich ist. In der vorliegenden Arbeit konnten lange Zellausstülpungen der Hepatozyten vorzugsweise in dem weniger steifen Hydrogel beobachtet werden. Des Weiteren kam es zu größeren Zellansammlungen, die große Kolonien auch mit den anderen Zellarten zusammen ausbildeten, was eher für eine bessere Migration und Interaktion von Zellen untereinander in geringer steifen Hydrogelen spricht. Dies könnte auch daran liegen, dass durch die größere Porenstruktur die Zellen mehr Freiraum hatten größere Kolonien zu bilden und sich allgemein leichter durch die größeren Poren bewegen konnten, um sich zu finden.

Hepatozyten tolerieren nur sehr geringe Scherspannungen [67]. Im Körper sind Hepatozyten durch den Disse-Raum, sowie von Endothelzellen als Barriere abgeschirmt. Dieser Aspekt wird häufig in Chip-Modellen nicht berücksichtigt und Hepatozyten werden in Hydrogel eingebettet (z. B. in Sandwichkultur) direkten Scherspannungen innerhalb eines Kanals ausgesetzt. So entdeckten Renner et al. einen erhöhten Sauerstoffverbrauch der Hepatozyten, während diese in einem Chip perfundiert wurden. Sie vermuten, dass dies auf erhöhten zellularen Stress hinweist, der durch die Scherbeanspruchung ausgelöst wurde [87]. Auch Tanaka et al. ermittelten eine geringere metabolische Aktivität sowie eine morphologische Veränderung von Hepatozyten, mit zunehmender Scherspannung [105]. In dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Model wurde diese Abgrenzung berücksichtigt, indem die eingebetteten Hepatozyten von den Blutgefäßen und somit von den Scherspannungen durch die Strömung entlang der Endothel-Gefäßwände abgegrenzt wurden. Die Hepatozyten behielten ihre Morphologie auch nach drei Tagen dynamischer Kultivierung bei und zeigten keine Unterschiede zur statischen Kontrolle. Der Effekt der Perfusion sollte in weiteren Experimenten über einen längeren Kultivierungszeitraum untersucht werden. Dazu würde sich vor allem das Modell mit parallel verlaufenden Gefäßen eignen, um einen Druckgradienten innerhalb des Lebergewebes zu erzeugen. Dies könnte die Polarisierung der Hepatozyten unterstützen wodurch sich zum Beispiel der Disse-Raum ausbilden könnte.

Die Gruppe von Ali Khademhosseini untersuchte den Einfluss der einzelnen Leberzellarten auf ihre metabolische Aktivität und ihr allgemeines Zellverhalten, indem sie zunehmend komplexere Zellzusammensetzungen innerhalb von Lebersphäroiden entwickelten. So zeigte sich eine Ko-Kultivierung von HepG2 und HUVECs Zellen in einem Verhältnis von 8:2 als gute Zusammensetzung der Ko-Kultur. Die Produktion von Albumin durch die Zugabe von HUVECs stieg um das Zweifache an [53]. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten CCK-8 Werte, die für die metabolischen Aktivitäten von Zellen steht, waren in der Ko-Kultur von HepG22 und HUVECs im Vergleich zu HepG2 alleine im gleichen Medium erhöht. Dies zeigt, dass Hepatozyten die Zugabe von HUVECs als Ko-Kultur bevorzugen, anstelle alleine kultiviert zu werden. Die Verwendung von Ko- bzw. Tri-Kulturen der Hepatozyten mit entweder Fibroblasten oder zusätzlichen HUVECs, zeigte auch in der vorliegenden Arbeit den Anstieg der metabolischen Aktivität. So zeigte sich eine erhöhte Albumin-Produktion, wenn die Hepatozyten in einem Verhältnis von 5:1 zu den Fibroblasten ko-kultiviert wurden, im Vergleich zu der Ko-Kultivierung in einem Verhältnis von 2:1. In einem ähnlichen Verhältnis wurde auch die Zellzusammensetzung in der Tri-Kultur in der vorliegenden Arbeit gewählt. Ebenfalls wurde in der Studie von Lasli erwähnt, dass die Zelllinie HepG2 für Hepatozyten

zwar zum Teil nicht ausreichende metabolische Aktivitäten im Vergleich zu primären Hepatozyten besitzen, sich aber trotzdem für erste Modelle ausreichend eignen, um erste Parameter im Modell anzupassen [53]. Im nächsten Schritt änderte die Gruppe die Hepatozyten Zelllinie zu HepaRG, die den primären Hepatozyten noch näher kommen, während ihre Kultivierung erleichtert ist [115]. Des Weiteren untersuchten sie den Einfluss der einzelnen Zellen im Verband, indem sie in einem Verhältnis von ca. 60/40 Non-parenchymalen Zellen der Leber, wie HUVECs, Kupfferzellen und Sternzellen zu den Hepatozyten hinzugaben. Durch die Zugabe von Sternzellen, konnten deutliche Unterschiede in typischen Markern, wie Lipid-Akkumulation oder Entzündungsmarkern gefunden werden. Es wurden ebenfalls HUVECs anstelle von leber-sinosoidalen Endothelzellen genutzt, um ein erstes Modell zu entwickeln. Die Sternzellen trugen stark zur Produktion von extrazellulärer Matrix bei, ähnlich wie es Fibroblasten machen [22]. Das Verhältnis von 60:40 von Hepatozyten zu anderen Zellen sollte immer beibehalten werden, da es der *In-vivo*-Situation entspricht [6]. Um das Lebermodell der vorliegenden Arbeit im nächsten Schritt zu verbessern, sollten ebenfalls leberspezifische non-parenchymalen Zellen verwendet werden. Während für die erste Modellierung HUVECs und Fibroblasten gut geeignet waren, könnten im nächsten Schritt diese durch lebersinusoidale Endothelzellen und Lebersternzellen ausgetauscht werden. Ebenfalls könnten Kupfferzellen in das Modell eingebracht werden, um alle wichtigen Zellarten der Leber einzubeziehen und die Struktur der Leber besser nachzubilden. Vor allem Kupfferzellen spielen bei der Metastasierung der Leber eine wichtige Rolle, da sie wie leberspezifische Makrophagen agieren und somit die erste Barriere für das Ansiedeln von Tumorzellen bilden [80]. Um die metastatische Kaskade zu studieren, könnte nach der Optimierung der einzelnen Modelle, das Lebermodell mit dem Tumormodell zusammen geführt werden. Durch die Zusammenführung der beiden Modelle wäre es möglich, ein genaueres Bild der metastatischen Kaskade zu erhalten. Die zuvor im Medium entdeckten Metastasen könnten sich beispielsweise im Lebermodell ansiedeln und einen metastatischen Tumor ausbilden. Auch könnten pathologische Veränderungen des Lebergewebes, die durch die Ausschüttung verschiedener Tumorfaktoren ausgelöst werden, untersucht werden. Dies könnte zu neuen Ansatzpunkten für Tumormedikamente führen. Darüber hinaus könnten erste Risikoanalysen zu bestimmten Medikamenten erstellt werden, was zu einer Reduzierung der Anzahl der benötigten Tierversuche beitragen könnte. Die Zelllinie HepG2 könnte durch die besser geeignete Zelllinie HepaRG und weiter durch primäre Hepatozyten ersetzt werden, um die metabolische Aktivität der Leber noch besser zu studieren.

Tumormodelle

Wie auch in vorangegangenen Arbeiten [99] konnte gezeigt werden, dass das Einbringen von Endothelzellen in die umgebende Matrix um den Tumorsphäroid herum dazu beitrug, dass sich eine mikrovaskuläre Struktur innerhalb der Matrix ausbildet und dies dazu führt, dass metastasierende Tumore Metastasen in den künstlichen Blutkreislauf einbrachten [25]. Des Weiteren zeigten Tumorsphäroide, die mit Endothelzellen ko-kultiviert wurden, eine größere Wachstumsrate im der dynamischen Kultivierung [25]. Die Wichtigkeit der Wahl einer angepassten extrazellulären Matrix und von unterstützenden Zellen, wie Fibroblasten und Endothelzellen, zeigten auch Chen und Kollegen [20]. Dabei zeigten ihre Ergebnisse, dass eine dreidimensionale Umgebung, die Kollagen enthielt, eine bessere Anhaftung der Tumor Zellen zeigte, sowie eine bessere Proliferation. Ebenfalls konnten sie eine erhöhte Aktivierung der umgebenden Fibroblasten erkennen, sowie eine morphologische Veränderung in der Nähe der Tumorzellen. Die HUVECs in unmittelbarer Nähe bildeten vermehrte tubuläre Strukturen aus. Beide Indikatoren, trugen zum Fortschreiten des Tumors bei [20]. Gleiches konnte ebenfalls in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Besonders deutlich war die Anordnung der Endothelzellen zu tubulären Strukturen in dem Experiment zu erkennen, in denen nur

Fibroblasten in der umgebenden Matrix eingebettet wurden. Die kleineren abgezweigten gedruckten Kanäle formten sich vor allem in der Region um den Tumor herum neu um und bildet mikrovaskuläre Strukturen aus.

Ausblick

Einer der langfristigen Ziele dieser Arbeit ist die Verminderung von Tierversuchen. Um dies noch weiter zu fördern, könnten in anschließenden Projekten auch speziell angepasste synthetische Hydrogele verwendet werden. Durch vorschreitende Kenntnisse über Zellverhalten und auch Fortschritte in der Biomaterialtechnik, könnte man durch die Verwendung von synthetisch hergestellten Hydrogelen, auf die Verwendung von tierischen Materialien verzichten. Diese müssten soweit optimiert werden, dass durch das Einbringen von z. B. RGD-Sequenzen (spezielle Reihenfolge von Aminosäuren) die Anhaftung von Zellen verbessert werden würde. Des Weiteren sollten die Zellen diese Matrix wie die natürliche Umgebung wahrnehmen und die Matrix auch über einen spezifischen Zeitraum (ähnlich wie bei der Verwendung von Kollagen und Fibrin) degradieren und umgestalten können. Dabei sollten die Proliferation und das natürliche Zellverhalten (z. B. Ausbildung einer Endothelschicht oder Ausspreizung und Ausbreitung der Zellen, sowie die Produktion einer eigenen Matrix) durch die mechanischen und chemischen Eigenschaften begünstigt werden. Des Weiteren könnte die Verwendung von FBS durch humanes Thrombozytenlysate ersetzt werden, da dieses unter ethisch fraglichen Bedingungen gewonnen wird.

Um die Physiologie der Blutgefäße noch realitätsnäher abzubilden, sollten diese in nachfolgenden Studien eine mehrzellige Schicht aus Glattmuskelzellen enthalten. Auch könnten die gedruckten Makro-Gefäße stärker verzweigt gestaltet werden, wobei es von Vorteil wäre, Perizyten in die umgebende Matrix oder direkt um die kleineren Gefäße einzubringen, da diese stark dazu beitragen, dass Endothelzellen tubuläre Strukturen ausbilden. Leider konnte in dieser Arbeit der genaue Einfluss der dynamischen Kultivierung auf das Lebermodell noch nicht umfassend untersucht werden. In einem nächsten Schritt sollte in Bezug auf das Lebermodell auf eine präzisere Anordnung der einzelnen Zelltypen geachtet werden. Die Kultivierung mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten und Druckunterschieden könnte dazu führen, dass die Polarisierung der Hepatozyten stark beeinflusst wird, die metabolische Aktivität zunimmt und sich der Disse-Raum deutlich ausbildet. Es wäre von Vorteil, wenn ausschließlich leberspezifische Zellen verwendet würden. Anstelle der HUVECs könnten daher lebersinusoidale Endothelzellen und statt der Fibroblasten Leber-Sternzellen genutzt werden. Auch die Zelllinie HepaRG weist mehr Ähnlichkeiten mit primären Hepatozyten auf, sodass diese in einem nächsten Schritt verwendet werden sollte. Um den Einfluss aller parenchymalen Zellen zu erforschen, sollten auch Kupferzellen in das Modell integriert werden.

Um die metastatische Kaskade zu studieren, könnten die beiden Modelle (Leber und Tumor) zusammengeführt werden, um Faktoren der Entstehung von Metastasen frühzeitig analysieren zu können. So könnten die zuvor im Medium entdeckten Metastasen sich beispielsweise im Lebermodell ansiedeln und einen metastatischen Tumor ausbilden. Auch könnten die pathologischen Veränderungen des Lebergewebes, die durch die Ausschüttung verschiedener Tumorfaktoren ausgelöst werden, untersucht werden. Dies könnte zu Ansatzpunkten für neue Tumormedikamente führen. Darüber hinaus könnten erste Risikoanalysen zu bestimmten Medikamenten erstellt werden, wodurch die Anzahl an benötigten Tierversuchen reduziert werden könnte.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines 3D-biogedruckten In-vitro-Gefäßmodells. Dieses sollte eine Bildgebung während der Versuche am Modell und eine dynamische Kultivierung über mehrere Tage ermöglichen. Motivation für die Arbeit war, dass ein solches Labormodell zu neuen Erkenntnissen über die Mechanismen bei der Gewebeangiogenese beitragen kann und dass damit zudem in Zukunft die Anzahl notwendiger Tierversuche reduziert werden könnten. Es wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass ein solches In-vitro-3D-Modell mittels angepasster Bioprinting-Technik, einem dynamisch durchströmbar Bioreaktor und der Auswahl zellspezifisch passender Hydrogele realisiert werden kann. Ebenfalls sollte dieses Gefäßmodell im weiteren Verlauf mit einem Tumor-, sowie einem Lebermodell kombiniert werden.

Zu diesem Zweck wurde zunächst ein geeigneter Bioreaktor entwickelt, der hauptsächlich aus den Materialien PEEK und Mikroskopie-Deckgläsern bestand, um eine Bildgebung mittels High-Resolution-CT sowie herkömmlicher Licht- oder Fluoreszenzmikroskopie zu ermöglichen. Aufgrund seines Designs konnte der Bioreaktor sowohl mit 3D-gedruckten Strukturen eingesetzt werden, als auch für "2,5D"-Versuche, um die Reaktionen von Endothelzellen auf Scherbeanspruchung zu analysieren. Es wurden zudem verschiedene Modelle des Bioreaktors entwickelt, die entweder mit einem oder zwei Ein- bzw. Auslässen ausgestattet waren, um unterschiedliche Kanaldesigns zu verdrucken. Drei verschiedene Kanalstrukturen wurden ausgewählt, die jeweils spezifische Vorteile boten. So ermöglichte der einfache Doppelkanal das Einbringen eines Tumorsphäroids innerhalb der Verzweigung. Durch das weiterentwickelte Design des komplexer geformten Kanals konnten mehrere Situationen mit Tumorsphäroiden miteinander verglichen werden. Darüber hinaus konnte durch die Verzweigung von schmalen Kanälen eine physiologische Verengung simuliert werden, die die Durchflussgeschwindigkeit beeinflusste. Schließlich gab es parallele Kanäle, die unterschiedlich perfundiert werden konnten, um Druckgradienten innerhalb des Gewebes zu erzeugen oder eine Seite mit einem höheren Durchfluss als die andere zu versehen, um so arterielle auf der einen und venöse Strömungen auf der anderen Seite zu simulieren.

Damit diese Gefäßstrukturen physiologisch relevant waren, mussten sie eine vollständig ausgekleidete Endothelschicht als Barriere aufweisen, die während der gesamten dynamischen Kultivierung stabil blieb. Um dies zu erreichen, wurden Protokolle zur Herstellung geeigneter Gelatine und deren Zusammensetzung mit GFP-HUVECs erstellt und optimiert. Es zeigte sich, dass das beste Ergebnis zum Verdrucken der Biotinte erzielt wurde, wenn die Gelatine als Stammlösung einen Feststoffgehalt von zehn Prozent besaß und acht Stunden lang bei 80 °C gelöst wurde. Das entwickelte Protokoll zur Herstellung der Biotinte und des weiteren Verfahrens bis zum Druck ergab, dass HUVECs in eine Endkonzentration der Gelatine von 7 % Feststoffgehalt eingemischt werden mussten und dass diese Mischung anschließend eine Stunde lang bei 4 °C gelagert werden musste, um vollständig zu gelieren. Diese Kühlung hatte keinen negativen Einfluss auf die Viabilität der Zellen.

Es wurden unterschiedliche Hydrogelmaterialien und deren Kombinationen für die unterschiedlichen Modelle getestet. So ergab sich, dass das 2,5 %ige Fibrin-Hydrogel, das sehr stabil und klein-porig war, im Vergleich zu einem Kollagen-Fibrin-Gemisch besser geeignet war, damit HUVECs unter Scherbeanspruchung eine stabile und vollständige Endothelschicht ausbildeten. Wohingegen das großporige Kollagen-Fibrin Gemisch mit der Steifigkeit einer gesunden Leber (4,5 kPa) eine deutliche Erhöhung, im Vergleich zu einem steiferen Hydrogel (15,1 kPa), der metabolischen Aktivität von eingebrachten Hepatozyten hervorrief. So stieg die

Albumin- und MRP2-Produktion der Hepatozyten in dem weicheren Hydrogel, was durch die Zugabe von Fibroblasten und HUVECs erneut im weicheren Hydrogel gesteigert werden konnte. Die Bildgebung bestätigte ebenfalls die typische Anordnung von Kolonien der Hepatozyten stattfinden konnte und diese in der Ko- und Tri-Kultur mit den anderen Zellen interagierten. Das Einbringen von Fibroblasten in die umliegende Matrix der Gefäßstrukturen erhöhte ebenfalls die Anhaftung und Stabilisierung der HUVECs, was durch deutlichere Zell-Zell Verbindungen in Form von VE-Cadherin Einfärbungen nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren wurden Tumorsphäroide in das Gefäßsystem eingebracht, wobei sich zeigte, dass es vorteilhaft war, wenn die umgebende Matrix Fibroblasten und Endothelzellen enthielt. Dies führte unter dynamischer Kultivierung dazu, dass sich Mikrokanäle von den 3D-gedruckten Gefäßen in die Matrix oder sogar zum Tumor hin ausbildeten.

Um die Endothelschicht weiter zu stabilisieren, damit sie auch über einen langen Zeitraum während der dynamischen Kultivierung stabil bleibt, zeigte sich eine Verbesserung dadurch, dass die Zellen mindestens drei Stunden in der Gelatine kultiviert werden mussten, bevor diese als Opfermaterial ausgespült wurde, damit sie an der umgebenden Matrix anhaften konnten. Ebenfalls zeigte es eine Verbesserung, wenn die Endothelzellen erst drei Tage lang unter statischen Bedingungen vollständig konfluent wachsen konnten, bevor die dynamische Kultivierung startete. Die Erstellung von Mikrokanälen mittels PDMS-Stempel-Methode oder Doppel-Opfermaterial-Methode zeigten gute Ergebnisse, wobei vor allem die Stempelmethode eine hohe Reproduzierbarkeit aufwies, während die Doppel-Opfermaterial-Methode sich besonders zur Erstellung komplex verzweigter Strukturen eignete.

Die Arbeit enthält bereits viele Optimierungen hinsichtlich der Hydrogel und Zellzusammensetzung. Zukünftig könnten Blutgefäße realitätsnäher durch mehrschichtige Zellmodelle und stärkeren Verzweigungen gestaltet werden. Auch das Lebermodell könnte durch das Einbringen von leberspezifischen Zellen wie sinusoidale Endothelzellen und Kupferzellen integriert werden. Dynamische 3D-Kultivierungsbedingungen könnten die Hepatozyten-Polarisierung von primären Hepatozyten und deren metabolische Aktivität verbessern. Eine Kombination des Leber- und Tumormodells könnte die einzelnen Schritte der Metastasenbildung und tumorbedingte Veränderungen des umliegenden Gewebes analysierbar machen, mit Potenzial für neue Therapien und der eventuellen Reduzierung von Tierversuchen.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Abaci HE, Shuler ML (2015). Human-on-a-chip design strategies and principles for physiologically based pharmacokinetics/pharmacodynamics modeling. *Integrative Biology* 4:383–91.
- [2] Abu Rmilah A, Zhou W, Nelson E, Lin L, Amiot B, Nyberg SL (2019). Understanding the marvels behind liver regeneration. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 8:e340.
- [3] Ahmed TAE, Griffith M, Hincke M (2007). Characterization and inhibition of fibrin hydrogel-degrading enzymes during development of tissue engineering scaffolds. *Tissue Eng* 13:1469–77.
- [4] Antoine EE, Vlachos PP, Rylander MN (2014). Review of collagen i hydrogels for bioengineered tissue microenvironments: characterization of mechanics, structure, and transport. *Tissue Eng Part B Rev* 20:683–96.
- [5] Arslan N, Isik S, Uykan O (2010). Steady and disturbed flow effects on human umbilical vein endothelial cells (huvecs) in vascular system: an experimental study. *Acta Bioeng Biomech* 12:3–9.
- [6] Arterburn LM, Zurlo J, Yager JD, Overton RM, Heifetz AH (1995). A morphological study of differentiated hepatocytes in vitro. *Hepatology* 1:175–87.
- [7] August Krogh B (1919). The supply of oxygen to the tissues and the regulation of the capillary circulation. *J Physiol* 52:457.
- [8] Babraj JA, Cuthbertson DJR, Smith K, Langberg H, Miller B, Krogsgaard MR, Kjaer M, Rennie MJ (2005). Collagen synthesis in human musculoskeletal tissues and skin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:864–9.
- [9] Baltazar T, Merola J, Catarino C, Xie CB, Kirkiles-Smith NC, Lee V, Hotta S, Dai G, Xu X, Ferreira FC, Saltzman WM, Pober JS, Karande P (2020). Three dimensional bioprinting of a vascularized and perfusable skin graft using human keratinocytes, fibroblasts, pericytes, and endothelial cells. *Tissue Eng Part A* 26:227–38.
- [10] Baptista PM, Siddiqui MM, Lozier G, Rodriguez SR, Atala A, Soker S (2011). The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology* 53:604–17.
- [11] Bersini S, Jeon JS, Moretti M, Kamm RD (2014). In vitro models of the metastatic cascade: from local invasion to extravasation. *Drug Discov Today* 19:735–42.
- [12] Bertassoni LE, Cecconi M, Manoharan V, Nikkhah M, Hjortnaes J, Cristino AL, Barabaschi G, Demarchi D, Dokmeci MR, Yang Y, Khademhosseini A (2014). Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs. *Lab Chip* 14:2202–11.
- [13] Bhise NS, Manoharan V, Massa S, Tamayol A, Ghaderi M, Miscuglio M, Lang Q, Zhang YS, Shin SR, Calzone G, Annabi N, Shupe TD, Bishop CE, Atala A, Dokmeci MR, Khademhosseini A (2016). A liver-on-a-chip platform with bioprinted hepatic spheroids. *Biofabrication* 8:014101.
- [14] Birk David E. and Bruckner P (2005). Springer Berlin Heidelberg; , Collagen suprastructures. collagen: primer in structure, processing and assembly. *Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly*, p. 185–205.
- [15] Boas FE, Bodei L, Sofocleous CT (2017). Radioembolization of colorectal liver metastases: indications, technique, and outcomes. *Journal of Nuclear Medicine* 58:104–11.
- [16] Boettcher AN, Loving CL, Cunnick JE, Tuggle CK (2018). Development of severe combined immunodeficient (scid) pig models for translational cancer modeling: future insights on how humanized scid pigs can improve preclinical cancer research. *Front Oncol* 8:559.

- [17] Britannica T (2024). Liver. Encyclopedia Britannica.
- [18] Brodsky B, Persikov A V (2005). Fibrous proteins: poiled-coils, collagen and elastomers. *Adv Protein Chem* 70:301–39.
- [19] Campbell SB, Wu Q, Yazbeck J, Liu C, Okhovatian S, Radisic M (2021). Beyond polydimethylsiloxane: alternative materials for fabrication of organ-on-a-chip devices and microphysiological systems. *ACS Biomater Sci Eng* 7:2880–99.
- [20] Chen H, Cheng Y, Wang X, Wang J, Shi X, Li X, Tan W, Tan Z (2020). 3D printed in vitro tumor tissue model of colorectal cancer. *Theranostics* 10:12127–43.
- [21] Chhibber T, Shinde R, Lahooti B, Bagchi S, Varahachalam SP, Gaddam A, Jaiswal AK, Gracia E, Chand HS, Kaushik A, Jayant RD (2020). Hydrogels in tissue engineering. intelligent hydrogels in diagnostics and therapeutics. CRC Press:105–22.
- [22] Cho HJ, Kim HJ, Lee KJ, Lasli S, Ung A, Hoffman T, Nasiri R, Bandaru P, Ahadian S, Dokmeci MR, Lee J, Khademhosseini A (2021). Bioengineered multicellular liver microtissues for modeling advanced hepatic fibrosis driven through non-alcoholic fatty liver disease. *Small* 17:2007425.
- [23] Chung E, Rytlewski JA, Merchant AG, Dhada KS, Lewis EW, Suggs LJ (2015). Fibrin-based 3d matrices induce angiogenic behavior of adipose-derived stem cells. *Acta Biomater* 17:78–88.
- [24] Cunningham CC, Van Horn CG (2003). Energy availability and alcohol-related liver pathology. *Alcohol Research & Health* 27:291.
- [25] De Lorenzi F, Hansen N, Theek B, Daware R, Motta A, Breuel S, Nasehi R, Baumeister J, Schöneberg J, Stojanović N, von Stillfried S, Vogt M, Müller-Newen G, Maurer J, Sofias AM, Lammers T, Fischer H, Kiessling F (2024). Engineering mesoscopic 3d tumor models with a self-organizing vascularized matrix. *Adv Mater* 36:2303196.
- [26] Dewey Jr. CF (1984). Effects of fluid flow on living vascular cells. *J Biomech Eng* 106:31–5.
- [27] Diniz IMA, Chen C, Xu X, Ansari S, Zadeh HH, Marques MM, Shi S, Moshaverinia A (2015). Pluronic f-127 hydrogel as a promising scaffold for encapsulation of dental-derived mesenchymal stem cells. *J Mater Sci Mater Med* 26:1–10.
- [28] Dreyer L (2015). Die physiologie von endothelzellen im tissue engineering. Universität Hannover.
- [29] Ewart L, Apostolou A, Briggs SA, Carman C V., Chaff JT, Heng AR et al. (2022). Performance assessment and economic analysis of a human liver-chip for predictive toxicology. *Communications Medicine* 2:154.
- [30] Fang J, Hatch C, Andrejcsk J, Trigt W Van, Juat D, Chen Y-H, Matsumoto IS, Lee A, Hughes CCW (2024). A microphysiological hht-on-a-chip platform recapitulates patient vascular lesions. *BioRxiv PrePrint:2024.03*.
- [31] Friedman SL (2000). Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *Journal of Biological Chemistry* 275:2247–50.
- [32] Garreta E, Oria R, Tarantino C, Pla-Roca M, Prado P, Fernández-Avilés F, Campistol JM, Samitier J, Montserrat N (2017). Tissue engineering by decellularization and 3d bioprinting. *Materials Today* 20:166–78.
- [33] Ghajar CM, Blevins KS, Hughes CCW, George SC, Putnam AJ (2006). Mesenchymal stem cells enhance angiogenesis in mechanically viable prevascularized tissues via early matrix metalloproteinase upregulation. *Tissue Eng* 10:2875–88.
- [34] Gilgenkrantz H, Collin de l’Hortet A (2018). Understanding liver regeneration: from mechanisms to regenerative medicine. *American Journal of Pathology* 188:1316–27.
- [35] Gioffredi E, Boffito M, Calzone S, Giannitelli SM, Rainer A, Trombetta M, Mozetic P, Chiono V (2016). Pluronic f127 hydrogel characterization and biofabrication in cellularized constructs for tissue engineering applications. *Procedia CIRP* 49:125–32.

- [36] Golden AP, Tien J (2007). Fabrication of microfluidic hydrogels using molded gelatin as a sacrificial element. *Lab Chip* 7:720–5.
- [37] Gomez-Florit M, Pardo A, Domingues RMA, Graça AL, Babo PS, Reis RL, Gomes ME (2020). Natural-based hydrogels for tissue engineering applications. *Molecules* 25:5858.
- [38] Gori M, Giannitelli SM, Torre M, Mozetic P, Abbruzzese F, Trombetta M, Traversa E, Moroni L, Rainer A (2020). Biofabrication of hepatic constructs by 3d bioprinting of a cell-laden thermogel: an effective tool to assess drug-induced hepatotoxic response. *Adv Healthc Mater* 9:2001163.
- [39] Griffith LG, Swartz MA (2006). Capturing complex 3d tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:211–24.
- [40] Herbert SP, Stainier DYR (2011). Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:551–64.
- [41] Higuchi A, Aoki N, Yamamoto T, Gomei Y, Egashira S, Matsuoka Y, Miyazaki T, Fukushima H, Jyujiyoji S, Natori SH (2006). Bioinert surface of pluronic-immobilized flask for preservation of hematopoietic stem cells. *Biomacromolecules* 7:1083–9.
- [42] Horbett TA (2018). Fibrinogen adsorption to biomaterials. *J Biomed Mater Res A* 106:2777–88.
- [43] Hou YC, Cui X, Qin Z, Su C, Zhang G, Tang JN, Li JA, Zhang JY (2023). Three-dimensional bioprinting of artificial blood vessel: process, bioinks, and challenges. *Int J Bioprint* 9:740.
- [44] Hunt JA, Chen R, Van Veen T, Bryan N (2014). Hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine. *J Mater Chem* 2:5319–38.
- [45] Iredale JP (2007). Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *Journal of Clinical Investigation* 117:539–48.
- [46] Jadalannagari S, Ewart L (2024). Beyond the hype and toward application: liver complex in vitro models in preclinical drug safety. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 20:607–19.
- [47] Juliar BA, Keating MT, Kong YP, Botvinick EL, Putnam AJ (2018). Sprouting angiogenesis induces significant mechanical heterogeneities and ecm stiffening across length scales in fibrin hydrogels. *Biomaterials* 162:99–108.
- [48] Khademhosseini A, Vacanti JP, Langer R (2009). Progress in tissue engineering. *Sci Am* 300:64–71.
- [49] Kniazeva E, Weidling JW, Singh R, Botvinick EL, Digman MA, Gratton E, Putnam AJ (2012). Quantification of local matrix deformations and mechanical properties during capillary morphogenesis in 3d. *Integrative Biology* 4:431–9.
- [50] Kopnin BP (2000). Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry c/c of Biokhimiya* 65:2–27.
- [51] Kumar GN, Surapaneni S (2001). Role of drug metabolism in drug discovery and development. *Med Res Rev* 21:397–411.
- [52] Lang R, Stern MM, Smith L, Liu Y, Bharadwaj S, Liu G, Baptista PM, Bergman CR, Soker S, Yoo JJ, Atala A, Zhang Y (2011). Three-dimensional culture of hepatocytes on porcine liver tissue-derived extracellular matrix. *Biomaterials* 32:7042–52.
- [53] Lasli S, Kim HJ, Lee KJ, Suurmond CAE, Goudie M, Bandaru P, Sun W, Zhang S, Zhang N, Ahadian S, Dokmeci MR, Lee J, Khademhosseini A (2019). A human liver-on-a-chip platform for modeling nonalcoholic fatty liver disease. *Adv Biosyst* 3:1900104.
- [54] Lemmens TP, Bröker V, Rijpkema M, Hughes CCW, Schurgers LJ, Cosemans JMEM (2024). Fundamental considerations for designing endothelialized in vitro models of thrombosis. *Thromb Res* 236:179–90.
- [55] Leung CM, de Haan P, Ronaldson-Bouchard K, Kim GA, Ko J, Rho HS, Chen Z, Habibovic P, Jeon NL, Takayama S, Shuler ML, Vunjak-Novakovic G, Frey O,

- Verpoorte E, Toh YC (2022). A guide to the organ-on-a-chip. *Nature Reviews Methods Primers* 2:33.
- [56] Li CY, Stevens KR, Schwartz RE, Alejandro BS, Huang JH, Bhatia SN (2014). Micropatterned cell-cell interactions enable functional encapsulation of primary hepatocytes in hydrogel microtissues. *Tissue Eng Part A* 20:2200–12.
- [57] Li J, Chen M, Fan X, Zhou H (2016). Recent advances in bioprinting techniques: approaches, applications and future prospects. *J Transl Med* 14:1–15.
- [58] Maji S, Lee M, Lee J, Lee J, Lee H (2023). Development of lumen-based perfusable 3d liver in vitro model using single-step bioprinting with composite bioinks. *Mater Today Bio* 21:100723.
- [59] Mak KM, Png CYM (2020). The hepatic central vein: structure, fibrosis, and role in liver biology. *Anatomical Record* 303:1747–67.
- [60] Malandrino A, Kamm RD, Moeendarbary E (2018). In vitro modeling of mechanics in cancer metastasis. *ACS Biomater Sci Eng* 4:294–301.
- [61] Mandal A, Clegg JR, Anselmo AC, Mitragotri S (2020). Hydrogels in the clinic. *Bioeng Transl Med* 5:e10158.
- [62] Manns Michael P. and Cieplik N and SS (2016). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; , *Anatomie der leber*. In: Manns Michael P. and Schneidewind S, editor. *Praxis der Hepatologie*, p. 3–7.
- [63] Masic A, Bertinetti L, Schuetz R, Chang SW, Metzger TH, Buehler MJ, Fratzl P (2015). Osmotic pressure induced tensile forces in tendon collagen. *Nat Commun* 6:5942.
- [64] Meng F, Meyer CM, Joung D, Vallera DA, McAlpine MC, Panoskaltsis-Mortari A (2019). 3D bioprinted in vitro metastatic models via reconstruction of tumor microenvironments. *Advanced Materials* 31:1806899.
- [65] van Midwoud PM, Merema MT, Verpoorte E, Groothuis GMM (2010). An alternative approach based on microfluidics to study drug metabolism and toxicity using liver and intestinal tissue. *Lab Chip* 10:2778–86.
- [66] Mitchell RN, Schoen FJ (2010). , Blood vessels. *Robbins and Cotran: Pathologic Basic of Disease*. 8th ed., p. 516–7.
- [67] Miyoshi H, Ehashi T, Kawai H, Ohshima N, Suzuki S (2010). Three-dimensional perfusion cultures of mouse and pig fetal liver cells in a packed-bed reactor: effect of medium flow rate on cell numbers and hepatic functions. *J Biotechnol* 148:226–32.
- [68] Mori N, Akagi Y, Imai Y, Takayama Y, Kida YS (2020). Fabrication of perfusable vascular channels and capillaries in 3d liver-like tissue. *Sci Rep* 10:5646.
- [69] Morin KT, Tranquillo RT (2013). In vitro models of angiogenesis and vasculogenesis in fibrin gel. *Exp Cell Res* 319:2409–17.
- [70] Mueller S (2010). Liver stiffness: a novel parameter for the diagnosis of liver disease. *Hepat Med* 2:49–67.
- [71] Müller M, Becher J, Schnabelrauch M, Zenobi-Wong M (2015). Nanostructured pluronic hydrogels as bioinks for 3d bioprinting. *Biofabrication* 7:035006.
- [72] Müller M, Becher J, Schnabelrauch M, Zenobi-Wong M (2013). Printing thermoresponsive reverse molds for the creation of patterned two-component hydrogels for 3d cell culture. *J Vis Exp* 77:50637.
- [73] Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG (2004). Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *Journal of Bone and Joint Surgery* 86:1541–58.
- [74] Oliveira TS, Smirnow I, Santee KM, Miglino MA, Barreto R da SN (2023). Decellularized vascular scaffolds derived from bovine placenta blood vessels. *Arq Bras Cardiol* 120:e20220816.
- [75] Orbach SM, Ford AJ, Saverot S-E, Rajagopalan P, Rajagopalan P (2018). Multi-cellular transitional organotypic models to investigate liver fibrosis. *Acta Biomater* 82:79–92.

- [76] Ozougwu JC (2017). Physiology of the liver. *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences* 4:13–24.
- [77] Paget S (1989). Distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet*, I 571.
- [78] Palma E, Doornebal EJ, Chokshi S (2019). Precision-cut liver slices: a versatile tool to advance liver research. *Hepatology* 13:51–7.
- [79] Papaioannou TG, Stefanadis C, others (2005). Vascular wall shear stress: basic principles and methods. *Hellenic J Cardiol* 46:9–15.
- [80] Paschos KA, Majeed AW, Bird NC (2010). Role of kupffer cells in the outgrowth of colorectal cancer liver metastases. *Hepatology Research* 40:83–94.
- [81] Powers MJ, Domansky K, Kaazempur-Mofrad MR, Kalezi A, Capitano A, Upadhyaya A, Kurzawski P, Wack KE, Stolz DB, Kamm R, Griffith LG (2002). A microfabricated array bioreactor for perfused 3d liver culture. *Biotechnol Bioeng* 78:257–69.
- [82] Profumo A, Turci M, Damonte G, Ferri F, Magatti D, Cardinali B, Cuniberti C, Rocco M (2003). Kinetics of fibrinopeptide release by thrombin as a function of cacl 2 concentration: different susceptibility of fpa and fpb and evidence for a fibrinogen isoform-specific effect at physiological ca 2+ concentration. *Biochemistry* 42:12335–48.
- [83] Rajabi M, Mousa SA (2017). The role of angiogenesis in cancer treatment. *Biomedicines* 5:34.
- [84] Ramadori G, Moriconi F, Malik I, Dudas J (2008). Physiology and pathophysiology of the liver inflammation, damage and repair. *J Physiol Pharmacol* 59:107–17.
- [85] Ramanujan S, Pluen A, McKee TD, Brown EB, Boucher Y, Jain RK (2002). Diffusion and convection in collagen gels: implications for transport in the tumor interstitium. *Biophys J* 83:1650–60.
- [86] Remmer H (1970). The role of the liver in drug metabolism. *Am J Med* 49:617–29.
- [87] Rennert K, Steinborn S, Gröger M, Ungerböck B, Jank AM, Ehgartner J, Nietzsche S, Dinger J, Kiehntopf M, Funke H, Peters FT, Lupp A, Gärtner C, Mayr T, Bauer M, Huber O, Mosig AS (2015). A microfluidically perfused three dimensional human liver model. *Biomaterials* 71:119–31.
- [88] Ribatti D, Mangialardi G, Vacca A (2006). Stephen paget and the “seed and soil” theory of metastatic dissemination. *Clin Exp Med* 6:145–9.
- [89] Ribitsch I, Baptista PM, Lange-Consiglio A, Melotti L, Patruno M, Jenner F, Schnabl-Feichter E, Dutton LC, Connolly DJ, van Steenbeek FG, Dudhia J, Penning LC (2020). Large animal models in regenerative medicine and tissue engineering: to do or not to do. *Front Bioeng Biotechnol* 8:972.
- [90] Ricard-Blum S (2011). The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:1–19.
- [91] Romani P, Valcarcel-Jimenez L, Frezza C, Dupont S (2021). Crosstalk between mechanotransduction and metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22:22–38.
- [92] Ruoß M, Rebholz S, Weimer M, Grom-Baumgarten C, Athanasopulu K, Kemkemer R, Käß H, Ehnert S, Nussler AK (2020). Development of scaffolds with adjusted stiffness for mimicking disease-related alterations of liver rigidity. *J Funct Biomater* 11:17.
- [93] Samatov TR, Shkurnikov MU, Tonevitskaya SA, Tonevitsky AG (2015). Modelling the metastatic cascade by in vitro microfluidic platforms. *Prog Histochem Cytochem* 49:21–9.
- [94] Samatov TR, Tonevitsky AG, Schumacher U (2013). Epithelial-mesenchymal transition: focus on metastatic cascade, alternative splicing, non-coding rnas and modulating compounds. *Mol Cancer* 12:1–12.
- [95] Sanz-Horta R, Matesanz A, Gallardo A, Reinecke H, Jorcano JL, Acedo P, Velasco D, Elvira C (2023). Technological advances in fibrin for tissue engineering. *J Tissue Eng* 14:20417314231190290.
- [96] Saraswathibhatla A, Indana D, Chaudhuri O (2023). Cell–extracellular matrix mechanotransduction in 3d. *Nat Rev Mol Cell Biol* 24:495–516.

- [97] Sarrigiannidis SO, Rey JM, Dobre O, González-García C, Dalby MJ, Salmeron-Sanchez M (2021). A tough act to follow: collagen hydrogel modifications to improve mechanical and growth factor loading capabilities. *Mater Today Bio* 10:100098.
- [98] Schepers A, Li C, Chhabra A, Seney BT, Bhatia S (2016). Engineering a perfusable 3d human liver platform from ips cells. *Lab Chip* 16:2644–53.
- [99] Schöneberg J, De Lorenzi F, Theek B, Blaeser A, Rommel D, Kuehne AJC, Kießling F, Fischer H (2018). Engineering biofunctional in vitro vessel models using a multilayer bioprinting technique. *Sci Rep* 8:10430.
- [100] Schrieber R, Gareis H (2007). John Wiley & Sons; . *Gelatine handbook theory and industrial practice*.
- [101] Sobrino A, Phan DTT, Datta R, Wang X, Hachey SJ, Romero-López M, Gratton E, Lee AP, George SC, Hughes CCW (2016). 3D microtumors in vitro supported by perfused vascular networks. *Sci Rep* 6:31589.
- [102] Sun Y, Zhang B, Xia L (2021). Effect of low wall shear stress on the morphology of endothelial cells and its evaluation indicators. *Comput Methods Programs Biomed* 208:106082.
- [103] Tan B, Gan S, Wang X, Liu W, Li X (2021). Applications of 3d bioprinting in tissue engineering: advantages, deficiencies, improvements, and future perspectives. *J Mater Chem B* 9:5385–413.
- [104] Tan J, Li L, Wang H, Wei L, Gao X, Zeng Z, Liu S, Fan Y, Liu T, Chen J (2021). Biofunctionalized fibrin gel co-embedded with bmscs and vegf for accelerating skin injury repair. *Materials Science and Engineering C* 121:111749.
- [105] Tanaka Y, Yamato M, Okano T, Kitamori T, Sato K (2006). Evaluation of effects of shear stress on hepatocytes by a microchip-based system. *Meas Sci Technol* 17:3167.
- [106] Thomas A, Orellano I, Lam T, Noichl B, Geiger MA, Amler AK, Kreuder AE, Palmer C, Duda G, Lauster R, Kloke L (2020). Vascular bioprinting with enzymatically degradable bioinks via multi-material projection-based stereolithography. *Acta Biomater* 117:121–32.
- [107] Toepke MW, Beebe DJ (2006). PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications. *Lab Chip* 6:1484–6.
- [108] Tsang VL, Chen AA, Cho LM, Jadin KD, Sah RL, DeLong S, West JL, Bhatia SN (2007). Fabrication of 3d hepatic tissues by additive photopatterning of cellular hydrogels. *The FASEB Journal* 21:790–801.
- [109] Vacanti CA (2006). The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med* 10:569–76.
- [110] Wang X, Ao Q, Tian X, Fan J, Tong H, Hou W, Bai S (2017). Gelatin-based hydrogels for organ 3d bioprinting. *Polymers (Basel)* 9:401.
- [111] Wang X, Liu C (2018). Fibrin hydrogels for endothelialized liver tissue engineering with a predesigned vascular network. *Polymers (Basel)* 10:1048.
- [112] Wolfbeis OS, Urban G (2006). Springer Series; . *Chemical sensors and biosensors methods and applications series*.
- [113] Wüst S, Müller R, Hofmann S (2011). Controlled positioning of cells in biomaterials—approaches towards 3d tissue printing. *J Funct Biomater* 2:119–54.
- [114] Xia T, Zhao R, Feng F, Yang L (2020). The effect of matrix stiffness on human hepatocyte migration and function-an in vitro research. *Polymers (Basel)* 12:1903.
- [115] Zeilinger K, Freyer N, Damm G, Seehofer D, Knöspel F (2016). Cell sources for in vitro human liver cell culture models. *Exp Biol Med* 241:1684–98.
- [116] Zhang YS, Khademhosseini A (2017). Advances in engineering hydrogels. *Science* (1979) 356:eaaf3627.
- [117] Zhang YS, Yue K, Aleman J, Mollazadeh-Moghaddam K, Bakht SM, Yang J, Jia W, Dell’Erba V, Assawes P, Shin SR, Dokmeci MR, Oklu R, Khademhosseini A (2017). 3D bioprinting for tissue and organ fabrication. *Ann Biomed Eng* 45:148–63.

- [118] Zhang Z, Jin Y, Yin J, Xu C, Xiong R, Christensen K, Ringeisen BR, Chrisey DB, Huang Y (2018). Evaluation of bioink printability for bioprinting applications. *Appl Phys Rev* 5:041304.
- [119] Zhou X, Nowicki M, Sun H, Hann SY, Cui H, Esworthy T, Lee JD, Plesniak M, Zhang LG (2020). 3D bioprinting-tunable small-diameter blood vessels with biomimetic biphasic cell layers. *ACS Appl Mater Interfaces* 12:45904–15.

8 Anhang

G-Code Doppelkanal

G1 X0 Y0.2
G1 X0 Y0.2 E0.001 F40.000
G1 X0 Y0.4 E0.001
G1 X0 Y0.2 E0.001

G1 X0 Y2 E0.001 F80.00
G1 X0.061 Y2.625 E0.001 F80
G1 X0.212 Y3.25 E0.001
G1 X0.532 Y3.875 E0.001
G1 X1 Y4.5 E0.001
G1 X1.468 Y5.125 E0.001
G1 X1.788 Y5.75 E0.001
G1 X1.953 Y6.375 E0.001
G1 X2 Y7 E0.001
G1 X1.953 Y7.625 E0.001
G1 X1.788 Y8.25 E0.001
G1 X1.468 Y8.875 E0.001
G1 X1 Y9.5 E0.001
G1 X0.532 Y10.125 E0.001
G1 X0.212 Y10.75 E0.001
G1 X0.061 Y11.375 E0.001
G1 X0 Y12 E0.001
G1 X0 Y12 Z-0.2
G1 X0 Y12 Z0.2
G1 X1.000 Y10.000 F7800.000

G1 X0 Y12
G1 X0 Y13.8 E0.001 F7800.000

G1 X0 Y12 E0.001 F80.000
G1 X-0.061 Y11.375 E0.001 F80
G1 X-0.212 Y10.75 E0.001
G1 X-0.532 Y10.125 E0.001
G1 X-1 Y9.5 E0.001
G1 X-1.468 Y8.875 E0.001
G1 X-1.788 Y8.25 E0.001
G1 X-1.953 Y7.625 E0.001
G1 X-2 Y7 E0.001
G1 X-1.953 Y6.375 E0.001
G1 X-1.788 Y5.75 E0.001
G1 X-1.468 Y5.125 E0.001
G1 X-1 Y4.5 E0.001
G1 X-0.532 Y3.875 E0.001
G1 X-0.212 Y3.25 E0.001
G1 X-0.061 Y2.625 E0.001
G1 X0 Y2 E0.001
G1 X0 Y2 Z-0.2
G1 X0 Y2 Z0.2
G1 X-1 Y4 F7800.000
G1 X0 Y2 Z0.5

G-Code Komplexer Kanal

```

RIGHT PART OUT
G1 F80
G1 X0 Y0 Z0 E1      Inlet
G1 X0 Y-1.5 Z0 E1   point_C3_in
G1 X0.3 Y-2 Z0 E1  \
G1 X1 Y-2.5 Z0 E1  \
G1 X2 Y-3 Z0 E1    } outer channel upper half
G1 X2.7 Y-3.5 Z0 E1 /
G1 X3 Y-4 Z0 E1    / point_M1
                    | outer channel straight part
G1 X3 Y-9 Z0 E1    \
G1 X2.7 Y-9.5 Z0 E1 \
G1 X2 Y-10 Z0 E1   } outer channel lower half
G1 X1 Y-10.5 Z0 E1 /
G1 X0.3 Y-11 Z0 E1 /
G1 X0 Y-11.5 Z0 E1
G1 X0 Y-11.5 Z-0.2 point_C3_out
G1 X0 Y-11.5 Z2

LEFT PART OUT
G1 F400
G1 X0 Y-1.5 Z2
G1 F80
G1 X0 Y-1.5 Z0 E1   point_C3_in
G1 X-0.3 Y-2 Z0 E1 \
G1 X-1 Y-2.5 Z0 E1 \
G1 X-2 Y-3 Z0 E1   } outer channel upper half
G1 X-2.7 Y-3.5 Z0 E1 /
G1 X-3 Y-4 Z0 E1   /
                    | outer channel straight part
G1 X-3 Y-9 Z0 E1   \ point_M2
G1 X-2.7 Y-9.5 Z0 E1 \
G1 X-2 Y-10 Z0 E1  } outer channel lower half
G1 X-1 Y-10.5 Z0 E1 /
G1 X-0.3 Y-11 Z0 E1 /
G1 X0 Y-11.5 Z0 E1 point_C3_out
G1 X0 Y-13.5 Z0 E1 Outlet

G1 X0 Y-13.5 Z5
G1 F400
G1 X0 Y-1.5 Z0     point_C3_in

INNER CHANNELS
G1 F80
G1 X0 Y-4.5 Z0 E1
G1 X-0.3 Y-5.5 Z0 E1
G1 X-1 Y-6 Z0 E1   point_A2
G1 X-1.5 Y-6.5 Z0 E1
G1 X-3 Y-9 Z0 E1   point_M2

G1 X-3 Y-9 Z5
G1 X3 Y-4 Z0       point_M1
G1 X1.5 Y-6.5 Z0 E1
G1 X1 Y-7 Z0 E1

G1 X0.3 Y-7.5 Z0 E1 point_A1
G1 X0 Y-8.5 Z0 E1
G1 X0 Y-11.5 Z0 E1
G1 X0 Y-11.5 Z2   point_C3_out

```

G-Code Parallel

G1 F80
 G1 X0 Y0 Z0 E1
 G1 X0 Y-23.5 Z0 E1
 G1 X0 Y-23.5 Z-0.2
 G1 X0 Y-23.5 Z5

G1 X6.5 Y0 Z5
 G1 X6.5 Y0 Z0
 G1 X6.5 Y0 Z0 E1
 G1 X6.5 Y-23.5 Z0 E1
 G1 X6.5 Y-23.5 Z-0.2
 G1 X6.5 Y-23.5 Z5

Tabelle 4: Mittelwerte der Kompressionsversuche sowie deren Standardabweichungen für die Bereiche 5-10% Kompression, sowie 10-15% Kompression für die einzelnen Hydrogele. Die Werte sind in kPa angegeben (n=3).

	Dehnungsbereich			
	5 – 10 %		10 – 15 %	
	E-Modul kPa	Standardabweichung kPa	E-Modul kPa	Standardabweichung kPa
Fibrin	27,60	1,15	27,50	1,37
CF _{High}	15,10	2,64	15,80	3,08
CF _{Low}	4,50	0,04	4,90	0,65
Kollagen	5,30	4,31	5,50	3,73

Tabelle 5: Gemessener Wasserverlust der einzelnen Proben aus dem Kompressionsversuch. Dabei ist der Mittelwert des Wasserverlustes prozentual zum Anfangsgewicht angegeben. n=3.

	Wasserverlust (%)	Standardabweichung (%)
Fibrin	9,83	2,21
CF _{High}	51,82	13,95
CF _{Low}	64,70	4,64
Kollagen	68,11	5,75

Tabelle 6: Porengrößen der unterschiedlichen Hydrogele aus den REM-Bildern ermittelt.

	Kollagen	Fibrin	CF _{High}	CF _{Low}
Porengrößen (µm)	1,07	0,08	0,91	1,13

Tabelle 7: Übersicht der gemessenen Breiten von vier unterschiedlichen Kanälen eines Stempels an jeweils fünf unterschiedlichen Messpunkten. Die mittlere Breite beträgt dabei 1,6mm mit einer Standardabweichung von 44 μm .

Messung	#1 (μm)	#2 (μm)	#3 (μm)	#4 (μm)	#5 (μm)	Mittelwert (μm)	SD (μm)
Strang 1	1642	1710	1685	1691	1592	1664	42
Strang 2	1613	1593	1642	1632	1612	1618	17
Strang 3	1560	1594	1600	1698	1673	1625	52
Strang 4	1660	1659	1695	1586	1639	1648	36
Total						1639	44

Tabelle 8: Mittelwert und Standardabweichung (SD) der kleineren Gelatine-Verbindungssträngen mit einem vorgegebenen Durchmesser von 33 μm . Diese wurden mit der Software ImageJ aus unterschiedlichen mikroskopischen Aufnahmen an jeweils fünf Strängen und fünf Messpunkten ermittelt. Dabei resultiert ein mittlerer Durchmesser von 35 μm mit einer Standardabweichung von 4 μm .

Messung	#1 (μm)	#2 (μm)	#3 (μm)	#4 (μm)	#5 (μm)	Mittelwert (μm)	SD (μm)
Strang 1	34	32	31	31	33	32	1
Strang 2	29	28	32	31	34	31	2
Strang 3	35	38	38	35	35	36	2
Strang 4	42	39	39	37	39	39	2
Strang 5	37	35	36	40	36	37	2
Total						35	4

Tabelle 9: Mittelwert und Standardabweichung (SD) der größeren Gelatine-Verbindungssträngen mit einem vorgegebenen Durchmesser von 50 μm . Diese wurden mit der Software ImageJ aus unterschiedlichen mikroskopischen Aufnahmen an jeweils fünf Strängen und fünf Messpunkten ermittelt. Dabei resultiert ein mittlerer Durchmesser von 52 μm mit einer Standardabweichung von 3 μm .

Messung	#1 (μm)	#2 (μm)	#3 (μm)	#4 (μm)	#5 (μm)	Mittelwert (μm)	SD (μm)
Strang 1	47	55	54	51	51	52	3
Strang 2	45	48	53	48	53	49	3
Strang 3	54	50	53	54	49	52	2
Strang 4	58	56	47	51	55	53	4
Strang 5	52	48	55	54	52	52	2
Total						52	3