

Solide 3D Hydrogelsysteme zur Kultivierung tierischer Zellen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

M. Sc. Ferdinand Martin Rüdinger
geboren am 16.06.1986 in Freiburg im Breisgau

2015

M. Sc. Ferdinand Martin Rüdinger: *Solide 3D Hydrogelsysteme zur Kultivierung tierischer Zellen*,
Dissertation, 2015

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Korreferent: Prof. Dr. Bernd Hitzmann

Tag der Promotion: 10. April 2015

*»Träume bleiben auch wichtig, denn ohne die, kann man sicher nichts erfinden...
Phantasie braucht der Mensch, mit einem Rest an Logik.«*

Sigrid & Bernard Simonin
† 10. August 1996

Danksagungen

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Thomas Scheper für die Möglichkeit zur Promotion, das entgegengebrachte Vertrauen und die motivierende Unterstützung. Außerdem danke ich ihm dafür, dass er für das finanziell gesicherte Umfeld gesorgt hat.

Bei Prof. Dr. Bernd Hitzmann bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats und Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitz.

Ich danke Prof. Dr. Dror Seliktar für die Bereitstellung der Fibrinogen-basierten Hydrogele und den interessanten Einblick in seine Arbeitsgruppe. In diesem Zusammenhang möchte ich Olga Kossover, Revital Goldshmid, Eran Ivanir, Yonathan Lati und Lena Hazanov für die Wissensübermittlung rund um die Hydrogele sehr herzlich danken. Ein großer Dank gebührt auch Michal Nudel für die exzellente Organisation und Unterbringung in Haifa.

Insbesondere danke ich Iliyana Pepelanova und Antonina Lavrentieva für die hilfreichen Denkanstöße und die konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Dissertation sowie für die Unterstützung bei der Vollendung des Hydrogel-Reviews.

Vielen Dank an das gesamte Zellkulturteam für die fruchtbaren und interessanten Diskussionen, die Zellen und zahlreiche Medien. Danke, Antonina Lavrentieva, Rebecca Bongartz und Franziska Sambale. Bedanken möchte ich mich auch bei Christian Lüder für die Programmierung des Graphic Analyzers zur Auswertung der Mikropartikel sowie Lutz Dreyer und Holger Zernetsch für die Unterstützung am Laserkonfokalmikroskop und Mikrotom.

Andreas Prediger, Patrick Lindner, Tim Lücking, Antonina Lavrentieva und Franziska Sambale danke ich für die einzigartige Zeit während unserer gemeinsamen Dienstreisen.

Ebenso danke ich meinen Bürokollegen Maren Lönne, Alexandra Heilkenbrinker und Martin Pähler für das offene Ohr und die außerordentliche Toleranz die Wände mit Bildern von Mikropartikeln unterschiedlicher Art tapezieren zu dürfen.

Ich danke meinen Masteranden Lena Stuckenberg und Caroline Schneider-Barthold, den Bacheloranden Sina Christoffers, Nicolai Tornow und Mareike Rüter für ihr Engagement und die Beiträge, die in unterschiedlichem Maße zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Außerdem gilt ein großer Dank meinen Studien- und Arbeitskollegen, insbesondere denjenigen, die mich von Anfang an durch das Studium begleitet haben. Vielen Dank für die intensiven Freundschaften die daraus entstanden sind.

Meinen Eltern gebührt unermesslicher Dank für die stetige und vorbehaltlose Unterstützung während der Schulzeit, dem Studium und der Promotion, sowie die Geduld, mich auch in schwierigen Phasen zu ertragen.

Meinem Bruder Philipp danke ich für die typographischen und syntaktischen Korrekturen, die moralische Unterstützung im Studium und natürlich dafür, dass er immer für mich da ist.

Ganz besonders danke ich Vicky für ihre stetige Geduld, den Rückhalt und ihre Liebe.

Zusammenfassung

Solide Hydrogelsysteme bieten vielversprechende Möglichkeiten tierische Zellen in einer dreidimensionalen Umgebung zu kultivieren. Die Vielseitigkeit der Hydrogelmaterialien ermöglicht es, Strukturen mit definierten mechanischen und biochemischen Eigenschaften herzustellen. 3D Zellkultursysteme werden bereits für viele Anwendungen, einschließlich des Tissue Engineerings von Mikroorgansystemen, des Wirkstoffscreenings und der Entwicklung von Tumormodellen verwendet.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Zellwachstums in soliden 3D Fibrinogen-basierten Hydrogelkonstrukten, deren rheologische Charakterisierung sowie die Entwicklung uniformer Hydrogel-Mikropartikel zur Kultivierung adhärenter Zellen in Suspension.

Hierfür wurde eine Apparatur zur Herstellung von Mikropartikeln, der Encapsulator B-395 Pro, umfassend charakterisiert. Dabei wurde die Produktion monodisperser Ca-Alginat-Mikropartikel und Core-Shell-Mikrokapseln optimiert und untersucht, ob das Verfahren für die Verkapselung von lebenden Zellen geeignet ist. Als Modellorganismus diente die Bäckerhefe *S. cerevisiae*, die in Mikropartikeln und Core-Shell-Mikrokapseln eingeschlossen wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen nach dem Verkapselungsprozess eine hohe Viabilität aufweisen und Mikropartikel reproduzierbar hergestellt werden können. Mit einem bildbasierten Algorithmus konnte die durchschnittliche Zellzahl in den Mikropartikeln anhand mikroskopischer Aufnahmen bestimmt werden. Weitere Ergebnisse zeigen, dass auch tierische Zellen mit dem Verfahren erfolgreich verkapselt werden können. Mesenchymale Stammzellen wurden in Core-Shell-Mikrokapseln immobilisiert und in Suspension kultiviert.

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem eine Methode zur Herstellung von soliden 3D Fibrinogen-basierten Hydrogelkonstrukten etabliert, die eine vielfältige Untersuchung der Zellen ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Zelllinien in 3D Hydrogelkonstrukten unterschiedliche Zellmorphologien aufweisen. Mesenchymale Stammzellen bilden in den soliden Hydrogelen ein kompaktes dreidimensionales Zellnetzwerk aus, das anhand histologischer Schnitte beschrieben werden konnte. Zur Untersuchung des Zellwachstums wurde ein Proliferationstest und Fluoreszenzfärbungen an die 3D Zellkultur angepasst sowie die Sauerstoffkonzentration innerhalb der Hydrogelkonstrukte bestimmt. Anhand der analytischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Zellen in den soliden Hydrogelen migrieren, proliferieren und gewebeähnliche Strukturen ausbilden können. Mesenchymale Stammzellen erhalten dabei ihr Differenzierungsvermögen aufrecht.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass solide Strukturen mit Fibrinogen-basierten Hydrogelen geschaffen werden können, in denen tierische Zellen in einer dreidimensionalen Umgebung wachsen können. Außerdem ermöglicht die Herstellung von Mikropartikeln und Core-Shell-Mikrokapseln die Kultivierung adhärent wachsender Zellen in Suspension.

Schlagwörter: Hydrogel, 3D Zellkultur, Mikropartikel, Zellverkapselung

Abstract

Solid hydrogel systems provide promising techniques for the cultivation of mammalian cells in a three-dimensional environment. The versatility of the hydrogel material enables the production of structures with defined mechanical and biochemical properties. 3D cell culture systems are already used in many applications, including tissue engineering of micro-organ systems, drug screening and the development of tumor models.

The aim of this work was to investigate cell growth in solid 3D fibrinogen-based hydrogel constructs and their rheological properties. Another part of this thesis contains the development of uniform hydrogel microparticles for the cultivation of adherent mammalian cells in suspension.

For this purpose microparticles were manufactured with the Encapsulator B-395 Pro. The device was extensively characterized for finding the optimal parameters for the production of monodisperse Ca-alginate microparticles and core-shell microcapsules. Furthermore, investigations were carried out whether the method is suitable for the encapsulation of viable cells. Baker's yeast, *S. cerevisiae*, was encapsulated in microparticles and core-shell microcapsules and was used as a model organism. It was shown that the cells exhibit a high viability after the encapsulation process and that microparticles can be prepared reproducibly. The average cell count of the microparticles could be determined with an image-based algorithm by microscopic images. Additional results show that even mammalian cells can be successfully encapsulated with this technique. Mesenchymal stem cells were encapsulated in core-shell microparticles and effectively cultured in suspension.

In the present work, a method for the preparation of solid 3D fibrinogen-based hydrogel constructs was established, which allows various analysis of the cells. It was shown that different cell lines exhibit different cell morphologies during growth in the solid 3D hydrogel constructs. Mesenchymal stem cells form a three-dimensional network in the hydrogels, which could be documented by histological sections. For investigation of cell growth, a proliferation assay and fluorescence staining methods were adapted to 3D cell culture. In addition, the oxygen concentration within the hydrogel constructs was determined. The analytical studies demonstrated that cells in solid hydrogels migrate, proliferate and are able to form tissue-like structures. Furthermore, mesenchymal stem cells retain their capability to differentiate.

Altogether the results show that solid structures can be created from fibrinogen-based hydrogels in which mammalian cells are able to grow in a three-dimensional environment. Moreover, the production of microparticles and core-shell microcapsules allows the cultivation of adherently growing cells in suspension.

Keywords: hydrogel, 3D cell culture, microparticle, cell encapsulation

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
2	Zielsetzung	12
3	Theoretischer Hintergrund	13
3.1	3D Zellkultursysteme	13
3.2	Hydrogele als 3D Zellkultursystem	15
3.2.1	Klassifizierung von Hydrogelen	15
3.2.2	Semisynthetische Fibrinogen-basierte Hydrogele	17
3.3	Anwendungsbereiche von Hydrogelen	22
3.4	Mikropartikel zur Verkapselung von Zellen	23
3.4.1	Tropfenbildende Verfahren zur Herstellung von Mikropartikeln	25
4	Ergebnisse und Diskussion	29
4.1	Charakterisierung des Encapsulators B-395 Pro	29
4.1.1	Aufbau und Funktionsweise des Encapsulators	29
4.1.2	Auswertung der Mikropartikel mittels Bildverarbeitung	33
4.1.3	Herstellung und Charakterisierung von Mikropartikeln	34
4.1.4	Herstellung und Charakterisierung von Core-Shell-Mikrokapseln	38
4.2	Rheologische Charakterisierung von Hydrogelen	41
4.2.1	Messprinzip und Funktionsweise des Rheometer	42
4.2.2	Viskositätsfunktionen von Na-Alginatlösungen	44
4.2.3	Photosensitive Hydrogele	46
4.2.4	Thermoresponsive Hydrogele	50
4.3	Verkapselung und Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> in Mikropartikeln	54
4.3.1	Vergleich einer Kultivierung mit Mikropartikeln und Core-Shell-Mikrokapseln	55
4.3.2	Auswertung einer Kultivierung mittels Bilderverarbeitung	58
4.4	Immobilisierung und Kultivierung tierischer Zellen in 3D Hydrogelsystemen	63
4.4.1	Wachstumsverhalten unterschiedlicher Zelllinien in einem PF-Hydrogel	64
4.4.2	Kultivierung einer Fibroblastenzelllinie in einem PF-Hydrogel	66
4.4.3	Kultivierung mesenchymaler Stammzellen in Fibrinogen-basierten Hydrogelen	67
4.4.4	Verkapselung tierischer Zellen in Mikropartikeln	82

4.4.5	Verkapselung mesenchymaler Stammzellen in Core-Shell-Mikrokapseln	85
5	Zusammenfassung und Ausblick	88
5.1	Beurteilung des Encapsulators für die Verkapselung tierischer Zellen	89
5.2	Beurteilung der Fibrinogen-basierten Hydrogele zur Kultivierung tierischer Zellen	91
5.3	Herausforderungen in der Zukunft	93
A	Anhang: Material	95
A.1	Hefe- und Säugetierzellen	95
A.2	Medien, Puffersysteme und Lösungen	97
A.2.1	Medien und Kultursubstratpräparate	97
A.2.2	Puffersysteme und Lösungen für die Zellkultivierung und Fluoreszenz- färbung	97
A.2.3	Fibrinogen-basierte Hydrogele	98
A.2.4	Puffersysteme und Lösungen für die Verkapselung von Zellen	98
A.3	Geräte und Materialien	99
A.4	Chemikalien und Reagenzien	101
A.5	Software	104
B	Anhang: Methoden	105
B.1	Zellkulturtechniken	105
B.1.1	Revitalisieren der Säugetierzellen	105
B.1.2	Kultivierung und Passage der Säugetierzellen	105
B.1.3	Kryokonservierung von Säugetierzellen	106
B.1.4	Isolation der MSC aus Fettgewebe	106
B.2	Chemische Synthese der Fibrinogen-basierten Hydrogele	106
B.3	Herstellung und Kultivierung von Hydrogel-Mikropartikeln	108
B.3.1	Partikel mit Hefezellen	108
B.3.2	Partikel mit Säugetierzellen	109
B.4	Solide 3D Hydrogelkonstrukte für die Kultivierung tierischer Zellen	109
B.4.1	Zelldifferenzierung	111
B.5	3D Sphäroidkulturen	111
B.6	Analytische Methoden	112
B.6.1	Rheologische Messungen	112
B.6.2	Zellzahlbestimmung	113
B.6.3	Medienanalytik	114
B.6.4	Fixierung der Zellen	114
B.6.5	Zellfärbungen	115
B.6.6	Histologie	116
B.6.7	CellTiter-Blue [®] Proliferationstest	117
B.7	Zeitrafferaufnahmen	118

Verzeichnisse	120
Abkürzungsverzeichnis	120
Abbildungsverzeichnis	122
Tabellenverzeichnis	125
Literaturverzeichnis	125
Verzeichnis entstandener Abschlussarbeiten	131
Curriculum Vitae	132
Publikationen und Konferenzbeiträge	133

1 Einleitung

Weltweit leiden jedes Jahr mehrere Millionen Menschen an Organversagen oder Gewebeschäden infolge von Krankheiten oder Unfällen. Die WHO schätzt, dass alleine mehr als 7 Millionen Menschen jährlich an koronaren Herzkrankheiten sterben [1]. Durch eine rechtzeitige Behandlung kann das Überleben der meisten Patienten zwar gesichert werden, allerdings werden bei einem Infarkt innerhalb weniger Stunden bis zu einer Milliarde Herzmuskelzellen irreparabel geschädigt. Dies hat eine chronische Herzschwäche zur Folge, die das Sterberisiko langfristig signifikant erhöht [2].

Vielen Patienten könnte durch im Labor hergestelltes Zellmaterial oder Gewebe geholfen werden. Die Hoffnung ruht daher auf neuartigen Zelltherapien. Dazu werden dem Patienten Zellen entnommen, die *in vitro* vermehrt und in das erkrankte Organ transplantiert werden können. Ziel ist es, funktionsgestörte oder defekte Zellen durch die Anregung regenerativer Prozesse zu ersetzen.

Insbesondere adulte Stammzellen weisen ein großes Potential als therapeutische Zellen auf, da sie zum Beispiel leicht aus dem Knochenmark gewonnen werden können und ein hohes Vermögen zur Selbsterneuerung aufweisen. Patienteneigenes Zellmaterial verhindert zudem Abstoßungsreaktionen nach der Transplantation und macht die Einnahme von Immunsuppressiva überflüssig. Außerdem gibt es keine ethischen Bedenken, die gegen den Einsatz adulter Stammzellen sprechen [3, 4]. Bisher werden Zelltherapien nur bei Leukämiepatienten routinemäßig mit hämatopoetischen Stammzellen durchgeführt. Allerdings sind Zelltherapien für alle Erkrankungen denkbar, bei denen es zu Degenerationen oder zum Absterben von Zellen kommt, wie zum Beispiel bei einem Herzinfarkt oder Morbus Parkinson. Auch durch Osteoporose oder Arthrose degeneriertes Knochen- und Knorpelgewebe könnte durch den Einsatz adulter Stammzellen regeneriert werden.

Für eine Stammzelltherapie sind pro Patient in der Regel mehrere Millionen Zellen erforderlich. Der Anteil adulter Stammzellen im Knochenmark beträgt jedoch nur 0,1 %, so dass eine große Herausforderung darin besteht, die Stammzellen zu expandieren [5]. In der Biotechnologie ist die Zellkultivierung mittels konventioneller 2D Kultivierung in diesem Maßstab jedoch nicht wirtschaftlich. Um dennoch ausreichende Zellmengen für klinische Anwendungen bereitstellen zu können, ist es erforderlich neue, effiziente Produktionsverfahren zu entwickeln. Für eine großtechnische Produktion sind außerdem gerührte Bioreaktoren stets vorzuziehen, da im Labormaßstab etablierte Kultivierungsbedingungen häufig mit geringem Aufwand auf größere Volumina übertragen werden können.

Eine erfolgversprechende Technologie, Stammzellen in Suspensionsreaktoren zu expandieren, ist die Verkapselung der Zellen in biokompatible Hydrogel-Mikropartikel. Hydrogele sind dreidimensionale Netzwerke aus polymeren Ketten, die ein hohes Quellverhalten aufweisen und durch ihre chemischen und mechanischen Eigenschaften eine neuartige Möglichkeit darstellen Zellen in einer dreidimensionalen, *in vivo* ähnlichen Umgebung zu kultivieren.

Die Herausforderungen liegen dabei in der Entwicklung biomimetischer Hydrogele, die dynamische Eigenschaften der extrazellulären Matrix möglichst präzise imitieren und die Zelladhäsion an die Polymermatrix ermöglichen. Dazu sind eine Vielzahl an unterschiedlichen Synthesestrategien notwendig. Um Risiken für den Patienten zu minimieren, müssen außerdem vielfältige Testsysteme etabliert werden, so dass das Zellwachstum und die Wachstumsbedingungen während der Expansion *in vitro* kontrolliert werden können. Des Weiteren ist es notwendig effiziente Verfahren zu entwickeln, mit denen Stammzellen schonend in monodisperse Hydrogel-Mikropartikel verkapselt werden können, um sie anschließend in einem gerührten Bioreaktor unter kontrollierten Bedingungen zu expandieren.

2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist das Herstellen uniformer Hydrogel-Mikropartikel und die Entwicklung von Methoden zur Kultivierung adhärent wachsender Zellen in Suspension. Außerdem gilt es das Zellwachstums in soliden 3D Fibrinogen-basierten Hydrogelkonstrukten zu untersuchen und die Hydrogele rheologisch zu charakterisieren.

Dazu sollte eine Apparatur zur Herstellung von Mikropartikeln, der Encapsulator B-395 Pro, charakterisiert und die Vor- und Nachteile in Bezug auf die Verkapselung tierischer Zellen aufgezeigt werden. Es sollte sowohl die Produktion von Mikropartikeln als auch die Herstellung von Core-Shell-Mikrokapseln untersucht und der Einfluss veränderbarer Parameter analysiert werden. Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* sollte als Modellorganismus zur Untersuchung von Partikel-Kultivierungen dienen. Die Hefezellen sollten in Mikropartikel und Core-Shell-Mikrokapseln immobilisiert, in Suspension kultiviert und mit einem bildbasierten Verfahren analysiert werden. Zur Bestimmung der Zellzahl pro Mikropartikel, sollte sowohl der Durchmesser der Mikropartikel als auch die Anzahl und Größe der Hefezellcluster innerhalb der Mikropartikel detektiert werden.

Um das Wachstum unterschiedlicher tierischer Zellen in Fibrinogen-basierten Hydrogelen untersuchen zu können, sollte außerdem eine Methode zur Herstellung solider 3D Hydrogelkonstrukte etabliert werden. Dabei sollte der Schwerpunkt auf der Kultivierung mesenchymaler Stammzellen liegen, um deren Migration, Adhäsion und Proliferation in den Hydrogelkonstrukten nachzuweisen. Weiterhin sollten die Hydrogele durch rheologische Messungen charakterisiert werden.

3 Theoretischer Hintergrund

Die Kultivierung tierischer Zellen *in vitro* stellt eine grundlegende Technik zur Erforschung der Zell- und Gewebephysiologie außerhalb des Organismus dar. Bisher wurden Zellen auf zweidimensionalen Oberflächen, wie zum Beispiel in Gewebekulturflaschen, kultiviert. Dabei dienen die Ergebnisse, die aus 2D Zellkulturen hervorgehen, als Grundlage zur Interpretation komplexer biologischer Phänomene. Durch die *in vitro* Kultivierung wurden unter anderem Erkenntnisse über dynamische Zusammenhänge zwischen Zellfunktionen und Interaktionen mit der zellulären Umgebung gewonnen. Engler *et al.* bewiesen, dass die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (MSC) von den mechanischen Eigenschaften des 2D Kultursystems abhängig ist [6] und Chen *et al.* zeigten, dass die Wachstums- und Apoptoseraten durch den Grad der Zellstreckung bestimmt werden [7]. 2D Systeme können somit zur Untersuchung physiologischer Eigenschaften von Zellen verwendet werden. Allerdings wird das Zellverhalten, wie die Proliferation, Differenzierung und metabolische Aktivitäten, stark durch die zelluläre Umgebung beeinflusst [8].

3.1 3D Zellkultursysteme

In den letzten Jahrzehnten wurde deutlich, dass konventionelle 2D Zellkulturen enorme Einschränkungen aufweisen [9]. Zellen einer 2D Kultur wachsen in einer einzelligen Schicht als Monolayer. Sie sind einerseits mit der Kunststoffoberfläche verbunden, während die andere Seite der Zelle dem Nährmedium zugewandt ist (Abb. 3.1a). Dadurch können Zell-Zell-Kontakte lediglich an der Peripherie aufgebaut werden und die Weitergabe interzellulärer Signale ist eingeschränkt. Das komplexe Zusammenspiel vieler verschiedener Signale entscheidet jedoch darüber, ob eine Zelle differenziert, proliferiert oder Apoptose einleitet. Werden Zellen aus einem nativen dreidimensionalen Gewebe durch die Kultivierung in einem Monolayer räumlich begrenzt, weisen die Zellen deutliche Unterschiede in der Morphologie, Genexpression, Wirkstoffsensitivität, zellulären Signalen und der Differenzierung auf [10–12]. Zum Beispiel zeigten Petersen *et al.*, dass menschliche Brustepithelzellen sich in Tumorzellen transformieren, wenn sie in einem 2D System kultiviert werden und zu ihrer ursprünglichen Morphologie zurückkehren, wenn sie in einer 3D Umgebung proliferieren [13]. Ebenso können embryonale Stammzellen ihre Stammzeleigenschaften und ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung länger aufrechterhalten, wenn sie in 3D Systemen kultiviert werden [14]. Dies hat zur Folge, dass die mit 2D Kulturen gewonnenen Erkenntnisse nur bedingt auf *in vivo* Bedingungen übertragbar

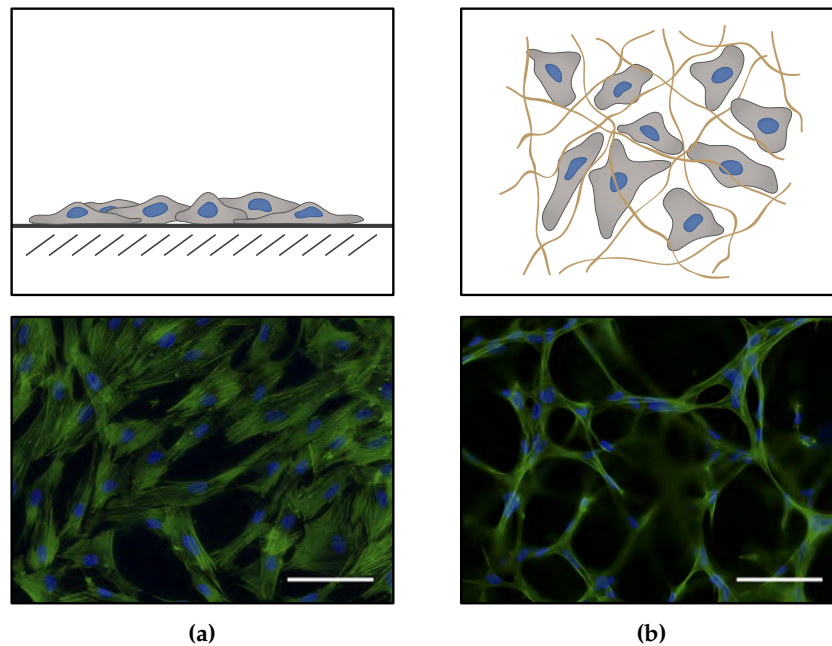


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung und mikroskopische Aufnahmen mesenchymaler Stammzellen (a) in einer 2D Kultur (Gewebekulturflasche) und (b) in einer 3D Kultur (PF-Hydrogel), Phalloidin-DAPI-Färbung, Messbalken: 100 μm .

sind und viele biologische Fragestellungen nur unzureichend beantwortet werden können [8]. Daher werden Methoden entwickelt, um Zellen in einer dreidimensionalen Umgebung zu kultivieren (Abb. 3.1b). Die Systeme ermöglichen detaillierte *in vitro* Untersuchungen von Differenzierungen, dem Zellverhalten und intrazellulären Interaktionen. Außerdem lassen sich mit einigen Systemen komplexe Gewebestrukturen nachbilden [15]. Die bisher etablierten 3D Zellkultursysteme lassen sich in vier Kategorien einteilen [8, 16, 17]:

1. Die Herstellung von *Zellaggregaten* ist eine gerüstfreie Kultivierungsmethode, bei der sich adhärent wachsende Zellen im Zellverband als Mikrokugeln akkumulieren und enge interzelluläre Verbindungen ausbilden. Durch die starke Adhäsion der Zellen bildet sich ein Zellsphäroid aus. Sphäroide können zum Beispiel mittels Hanging-drop-Technologie oder in speziell beschichteten Mikrotiterplatten hergestellt und anschließend in einem gerührten System kultiviert werden [18].
2. Zu den *synthetischen Scaffolds* gehören anorganische Materialien, wie zum Beispiel Hydroxyapatit, Tricalciumphosphat, Calciumphosphat Hemihydrat oder Zirkoniumdioxid-Keramiken sowie organische Materialien wie unter anderem Polystyrol oder Polyethylenglykol. Die Scaffolds weisen durch mikroporöse Strukturen eine große Wachstumsfläche auf, die sie den Zellen zur Verfügung stellen. Auch der Einsatz solider, mikroporöser Mikrocarrier in gerührten Systemen ist möglich. Allerdings sind die Poren der Materialien mit 200 μm deutlich größer als der durchschnittliche Zelldurchmesser (10 μm), so dass die Materialien eher als gekrümmte 2D Scaffolds fungieren [19, 20].

3. *Natürliche Scaffolds* bestehen aus Materialien der extrazellulären Matrix. Collagen-, Hyaluronsäurematrices oder Fibrinnanostrukturen können zum Beispiel mittels Elektrospinverfahren hergestellt werden und ermöglichen die Zelladhäsion unter anderem durch Integrinbindestellen. Vollständige extrazelluläre Matrices können durch Dezellularisierung aus Gewebe gewonnen werden [21].
4. *Hydrogele* bestehen aus Polymerketten und weisen ein außerordentlich hohes Quellverhalten auf. Im Unterschied zu den Scaffolds, bei denen die Zelladhäsion auf der Oberfläche stattfindet, schließen Hydrogele die Zellen vollständig ein. Hydrogele zeichnen sich durch eine hohe Vielseitigkeit aus und haben die *in vitro* Zellkultur maßgeblich erweitert. Sie stellen eine vielversprechende Möglichkeit für die Zellkultivierung in dreidimensionalen Systemen dar.

3.2 Hydrogele als 3D Zellkultursystem

Hydrogele sind dreidimensionale Netzwerke, die aus wasserunlöslichen, hydrophilen Polymerketten bestehen und sich durch ein breites Spektrum an mechanischen und chemischen Eigenschaften auszeichnen. Sie werden durch kovalente Bindungen oder physikalische Wechselwirkungen verknüpft und können mehr als das Tausendfache ihres Trockengewichts an Wasser aufnehmen ohne ihren Zusammenhalt zu verlieren. Durch die netzartigen Strukturen ist eine gewebeähnliche Elastizität gegeben, die den Transport von Sauerstoff, Nährstoffen und Stoffwechselprodukten ermöglicht [22]. Die Zellen wachsen in einer organisierten dreidimensionalen Matrix, in der sie von weiteren Zellen umgeben sind. Dabei wird das Verhalten einzelner Zellen durch die Interaktion mit benachbarten Zellen sowie der extrazellulären Matrix (EZM) kontrolliert. Solide Hydrogelkonstrukte können in der Regel unter milden, zytokompatiblen Bedingungen in nahezu jeder Größe und Form hergestellt werden [23, 24]. Als Ausgangsmaterial steht eine Vielzahl natürlicher und synthetischer Polymere zur Verfügung, wobei jedes Polymer Vor- und Nachteile aufweist [25]. Durch chemische Modifikationen der Polymerketten können zum Beispiel Liganden zur Zelladhäsion, Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren integriert oder die erforderliche Festigkeit und biologische Abbaubarkeit erreicht werden [26]. Dadurch können Hydrogele Teile der nativen extrazellulären Matrix nachbilden und ermöglichen es den Zellen in einer dreidimensionalen Umgebung zu wachsen.

3.2.1 Klassifizierung von Hydrogelen

Hydrogele können aufgrund ihrer vielseitigen molekularen Eigenschaften in unterschiedliche Kategorien eingeteilt werden. Zum einen können Hydrogele nach ihrer molekularen Ladung (kationisch, anionisch, neutral, ampholytisch), ihrer strukturellen Zusammensetzung (Copolymere, Homopolymere, interpenetrierende Netzwerke), nach ihren Vernetzungsvarianten (physikalisch, kovalent) oder nach der Empfindlichkeit auf Stimuli (pH-Wert, Temperatur,

Reaktionszeit, etc.) klassifiziert werden [27, 28]. Weit verbreitet ist auch die Einteilung nach der Herkunft der Polymere in natürliche, synthetische und semisynthetische Hydrogele [25].

Natürliche Hydrogele werden hauptsächlich aus Proteinen und Bestandteilen der extrazellulären Matrix, wie beispielsweise Collagen, Fibrin oder Hyaluronsäure hergestellt. Aber auch Materialien wie Alginate, Agarose oder Chitosan aus anderen biologischen Quellen können verwendet werden. Natürliche Hydrogele zeichnen sich durch eine ausgezeichnete Biokompatibilität und geringe Toxizität aus. Außerdem weisen Hydrogele, die aus der extrazellulären Matrix gewonnen werden, eine Vielzahl endogener Faktoren auf, die zelluläre Funktionen wie die Viabilität und Proliferation fördern können. Daher werden diese Hydrogele auch als zellfördernde Hydrogele bezeichnet (Abb. 3.2b) [19]. Allerdings ist die Zusammensetzung natürlicher Hydrogele sehr komplex und die Qualität aufgrund der natürlichen Herkunft chargenabhängig. Dadurch können Signale, die zelluläre Funktionen beeinflussen, kaum identifiziert werden. Aufgrund der hohen Variabilität der chemischen Struktur ist es zugleich schwierig die mechanischen und biochemischen Eigenschaften zu kontrollieren. Dies hat zur Folge, dass Hydrogele natürlicher Herkunft nicht reproduzierbar hergestellt werden können [29].

Synthetische Hydrogele werden hingegen aus künstlichen Polymeren, wie unter anderem Polyethylenglykol (PEG), Polyvinylalkohol (PVA), Polyethylenoxid (PEO) oder Polyacrylsäuren (PAA) hergestellt. Diese Materialien zeichnen sich durch eine konstante Qualität mit definierter chemischer Struktur aus, so dass Hydrogele mit reproduzierbaren mechanischen Eigenschaften erzeugt werden können. Synthetische Hydrogele kompensieren somit einen wesentlichen Nachteil natürlicher Hydrogele. Einige synthetische Polymere weisen besondere Eigenschaften auf und reagieren bereits auf geringe Temperatur- oder pH-Wert-Änderungen. Diese Polymere werden oft verwendet, um einen Phasenübergang von flüssig zu fest oder Konformationsänderungen zu induzieren, die in einer Volumenänderung resultieren [30]. Des Weiteren kann die Viabilität verkapselter Zellen durch synthetische Strukturen aufrechterhalten werden, obwohl sie keinerlei biologische Faktoren zur Verfügung stellen, die Einfluss auf das Wachstum oder die Migration der Zellen nehmen können [31]. Synthetische Hydrogele werden häufig auch als zelltolerante Hydrogele bezeichnet (Abb. 3.2a) [19].

Seit einigen Jahren stehen insbesondere semisynthetische Hydrogele im Fokus der Materialentwicklung. Die grundlegende Struktur bilden dabei synthetische Polymere, an die natürliche Komponenten wie beispielsweise Teile eines Proteins oder Polysaccharide konjugiert werden. Dazu stehen unterschiedliche chemische Reaktionen wie unter anderem die metallfreie Klickchemie, radikalische Copolymerisationen mit Peroxiden oder Schiff-Base-Reaktionen zur Verfügung [24]. Auf diese Weise ist es möglich aus synthetischen Polymeren zellfördernde Hydrogele zu entwickeln, die sowohl definierte chemische und mechanische Eigenschaften als auch biologische Informationen in Form von Liganden oder Wachstumsfaktoren enthalten. Zum Beispiel sind Hydrogele aus reinem PEG gegenüber Zellen und Proteinen inert. Durch Modifikationen mit Peptidsequenzen können jedoch Protein-Polymer-Hybridstrukturen erzeugt werden, die die Zelladhäsion innerhalb des Hydrogels ermöglichen [32]. Eine aussichtsreiche Gruppe solcher semisynthetischer Hydrogele basiert auf der kovalenten Bindung linearer oder

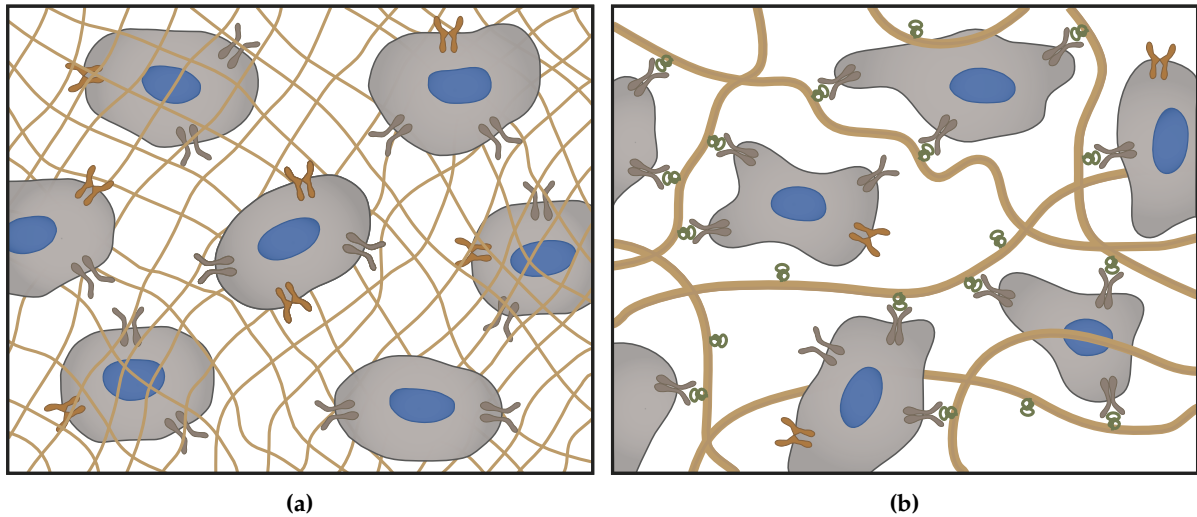


Abbildung 3.2 (a) Zelltolerante Hydrogele stellen ein 3D Netzwerk aus synthetischen Polymeren dar. Integrine oder andere Oberflächenrezeptoren der Zellen können jedoch nicht aktiviert werden, so dass die Zellen lediglich ihre Viabilität aufrechterhalten. (b) Zellfördernde Hydrogele aus natürlichen Polymeren stellen eine Vielzahl an Integrinbindestellen und Wachstumsfaktoren zur Verfügung, die an die EZM gebunden sind. Das Zellverhalten wird über Signalkaskaden, die durch Bindungen mit den Oberflächenrezeptoren der Zellen initiiert werden, gesteuert [19].

verzweigter, nicht-ionischer Polymere mit Proteinen der extrazellulären Matrix wie Collagen, Albumin oder Fibrinogen [33–35].

3.2.2 Semisynthetische Fibrinogen-basierte Hydrogele

Fibrinogen-basierte Hydrogele werden aus dem natürlichen Glykoprotein Fibrinogen und einem synthetischen Polymer über eine kovalente Konjugation hergestellt. Für die Synthese steht eine Vielzahl an Polymeren zur Verfügung, die unterschiedliche chemische und physikalische Eigenschaften aufweisen. Durch zusätzliche Modifikationen der Polymerketten können Strukturen geschaffen werden, die es erlauben aus flüssigen Hydrogelen über Polymerisationsreaktionen solide Hydrogelkonstrukte herzustellen. In dieser Arbeit wurden Hydrogele auf der Basis von Polyethylenglykol (PEG) und Pluronic[®] F127 untersucht. Beide Hydrogele wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dror Seliktar am Technion, Department of Biomedical Engineering in Haifa, Israel entwickelt und synthetisiert [36]. Die Hydrogele werden im Folgenden als PEG-Fibrinogen-Hydrogel (PF-Hydrogel) und Pluronic[®] F127-Fibrinogen-Hydrogel (FF-Hydrogel) bezeichnet.

Fibrinogen besteht aus zwei symmetrischen Domänen (166 kDa), die aus jeweils drei Polypeptidketten (α , β , γ) aufgebaut und über sechs Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede Polypeptidkette enthält etliche Zellsignaldomänen, darunter eine proteolytische Enzymschnittstelle und drei Integrinbindestellen zur Zelladhäsion. Davon befinden sich zwei RGD-Sequenzen (Arg-Gly-Asp) in der α -Kette und eine nicht-RGD-Sequenz in der γ -Kette [37]. Diese unterschiedlichen Eigenschaften ermöglichen die zellspezifische Adhäsion, die bei rein

synthetischen Hydrogelen nicht möglich ist. Außerdem erlauben die proteolytischen Domänen den Abbau des Hydrogels durch aktivierte Proteasen.

Das synthetische Polymer PEG ist ein nicht-toxisches, wasserlösliches Homopolymer, das aus Ethylenoxid-Monomeren besteht und bereits von der Food and Drug Administration (FDA) für eine Reihe klinischer Applikationen zugelassen ist. PF-Hydrogele können aus PEG mit unterschiedlichen Molekülmassen hergestellt werden. Die besten mechanischen Eigenschaften für die Kultivierung tierischer Zellen weist jedoch das PF-Hydrogel auf, das aus linearem 10 kDa PEG (PEO₂₂₂) synthetisiert wurde [35, 38].

Pluronic[®] F127 (Poloxamer 407) gehört zu den Poloxameren und ist ein nicht-ionisches synthetisches Triblockpolymer aus Polyethylenoxid- (PEO) und Polypropylenoxid- (PPO) Einheiten mit der Abfolge PEO-PPO-PEO. Der PEO-Anteil des Polymers ist wasserlöslich, während der PPO-Anteil nicht wasserlöslich ist. Daher ergeben sich für das Triblockpolymer sowohl amphiphile als auch thermoreversible Eigenschaften. Bei Raumtemperatur liegt eine Lösung des Polymers unter einer Konzentration von 20 % flüssig vor. Wird die Polymerlösung erwärmt, wird sie abhängig von der Polymerkonzentration und Temperatur gelartig-fest [39]. Der Übergang zu einer gelartigen Struktur beruht auf der Zunahme der Entropie. Durch Temperaturerhöhung werden an die PPO-Einheiten koordinierte Wassermoleküle freigesetzt, so dass sich die Polymereinheiten zu Micellen zusammenlagern. Die dehydrierten, stark hydrophoben PPO-Einheiten bilden den Micellkern, während sich die PEO-Einheiten zu den Wassermolekülen ausrichten. Die Micellbildung ist reversibel. Das bedeutet, dass sich die gelartigen Strukturen auflösen, wenn die Temperatur verringert wird [40]. Für die Synthese des FF-Hydrogels wird das Pluronic[®] F127 (PEO₉₉-PPO₆₇-PEO₉₉) mit einer relativen Molekülmasse 12,6 kDa verwendet [41].

Chemische Synthese

Die Herstellung der Fibrinogen-basierten PF- und FF-Hydrogele erfolgt in einer zweistufigen chemischen Synthese nach einem identischen Reaktionsmechanismus. Zunächst wird das synthetische Polymer (PEG bzw. Pluronic[®] F127) mit einer Acrylgruppe funktionalisiert. Dazu wird die Hydroxylgruppe des Polymers mit Triethylamin aktiviert und die Reaktion mittels Acryloylchlorid umgesetzt. Aus dieser Reaktion geht das Polymer-Diacrylat (PEGDA bzw. Pluronic[®] F127DA) hervor, das weitere Reaktionen eingehen kann [42]. In der zweiten Stufe werden denaturierte Fibrinogenfragmente kovalent durch eine Michael-Addition an das funktionalisierte Polymer gebunden. Dabei werden Esterbindungen zwischen freien Thiolen des Fibrinogens und den Acrylgruppen des Polymer-Diacrylats erzeugt. Aktive Thiolgruppen werden zusätzlich durch die Spaltung von Disulfidbrücken durch das Reduktionsmittel Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) generiert. Insgesamt weist das Glykoprotein 29 Aminosäuren mit Thiolgruppen (Cysteine) auf, die mit dem funktionalisierten Polymer reagieren können. Um zytotoxische Moleküle, die aus der chemischen Synthese hervorgehen können, zu eliminieren, wird das Polymer-Fibrinogen-Hydrogel abschließend mittels Dialysemembranen aufgereinigt

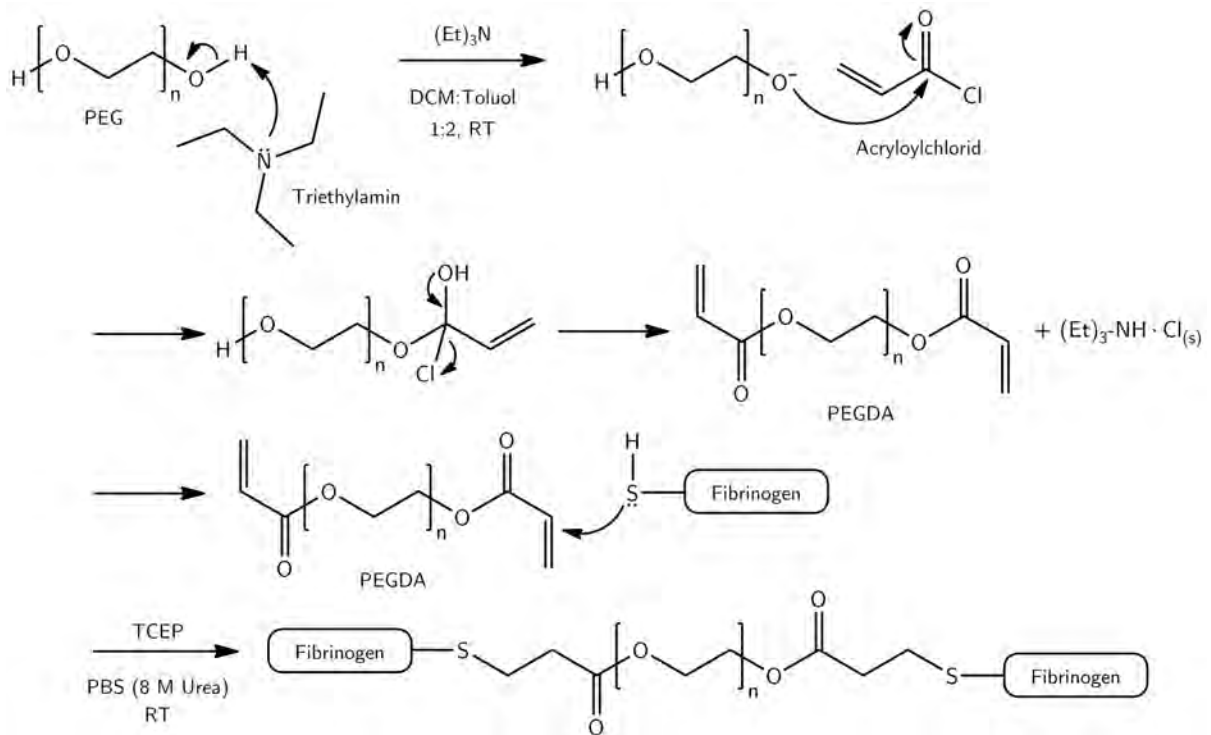


Abbildung 3.3 Reaktionsmechanismus der chemischen Synthese des PF-Hydrogels: Polyethylenglykol (PEG) wird mit Acryloylchlorid zu PEG-Diacrylat (PEGDA) umgesetzt. Über eine Michael-Addition wird anschließend Fibrinogen an PEGDA kovalent konjugiert, woraus das PF-Hydrogel hervorgeht [41].

(Abschnitt B.2) [41, 43]. Der Mechanismus der chemischen Synthese ist exemplarisch für das PF-Hydrogel in Abbildung 3.3 gezeigt.

Die Konjugationsreaktion wird mit einem Überschuss an funktionalisiertem Polymer umgesetzt. Nach der Synthese liegt sowohl freies als auch über eine Esterbindung an Fibrinogenfragmente gebundenes Polymer vor. Dadurch stehen Acrylgruppen für eine Polymerisationsreaktion zur Verfügung, so dass die Hydrogele unter Verwendung eines Photoinitiators irreversibel zu einem soliden Hydrogel vernetzt werden können. In Abbildung 3.4 ist ein konjugiertes Fibrinogenfragment und das Hydrogelnetzwerk schematisch dargestellt.

Vernetzung

Die Polymerisation der Hydrogele wird durch Radikale initiiert, die durch die Bestrahlung des Photoinitiators Irgacure[®] 2959 (4-(2-Hydroxyethoxy)phenyl-(2-propyl)-keton) mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm generiert werden. Dabei reagieren die Radikale mit den Acrylgruppen der Polymer-DA-Monomere unter Bildung kovalenter Bindungen zu polymeren Ketten. Ein Kettenabbruch findet durch Disproportionierung oder durch die Kombination zweier Polymer-DA-Radikale statt. Der Mechanismus der Polymerisationsreaktion ist exemplarisch für das PF-Hydrogel in Abbildung 3.5 gezeigt.

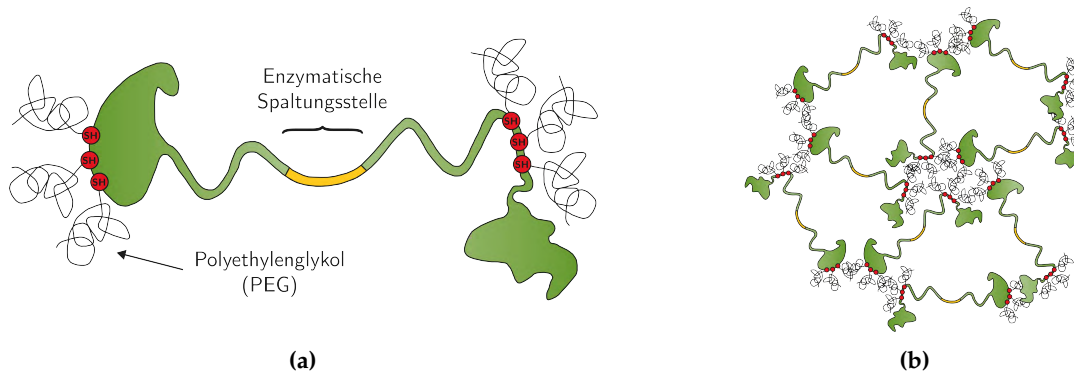


Abbildung 3.4 Schematische Darstellung eines Fibrinogen-basierten Hydrogels: (a) Konjugierte Fibrinogenfragmente weisen eine natürliche proteolytische Enzymschnittstelle (gelb) sowie mehrere Thiolgruppen (rot) auf, die für die kovalente Bindung des funktionalisierten Polymers zur Verfügung stehen. (b) Solide 3D Hydrogele können durch eine radikalische Polymerisationsreaktion hergestellt werden [35].

Trotz der Bildung zytotoxischer Radikale eignet sich der Photoinitiator für die Polymerisation der Hydrogele, da eine hohe Viabilität der verkapselten Zellen erzielt werden kann [44]. Dies ist auf die milden Reaktionsbedingungen, die geringe Zytotoxizität und die hohe katalytische Aktivität des Photoinitiators zurückzuführen. Dadurch kann eine ausreichende mechanische Stabilität der Hydrogele mit einer relativ kurzen UV-Bestrahlungsdauer erreicht werden [45]. Dennoch kann die Zellviabilität beeinträchtigt werden, wenn durch eine lange UV-Bestrahlung zu viele zytotoxische Radikale erzeugt werden. Außerdem kann eine zu hohe Konzentration des Photoinitiators oder Bestrahlungsintensität die Festigkeit des Hydrogels negativ beeinflussen. Darüber hinaus kann die Festigkeit der Hydrogele über die Konzentration an Polymer-Diacrylat, das für die Quervernetzung mitverantwortlich ist, variiert werden. Wird dem Hydrogel zusätzlich Polymer-Diacrylat hinzugefügt, stehen mehr Acrylgruppen für die Polymerisationsreaktion zur Verfügung, woraus ein festeres Hydrogel resultiert. Es ist daher notwendig die Bedingungen anzupassen, um die gewünschte Vernetzung zu erreichen, die für die Zellen am besten geeignet ist [44].

Beide Fibrinogen-basierten Hydrogele können irreversibel nach dem gleichen Mechanismus durch UV-Licht polymerisiert werden. Außerdem ist es möglich, die Hydrogele enzymatisch mit Thrombin zu vernetzen. Hierbei werden die Fibrinogenfragmente durch Thrombin gespalten und aneinander gebunden. Die konjugierten Polymere bleiben allerdings unberücksichtigt. Da die enzymatische Reaktion nur unzureichend kontrollierbar ist und somit die mechanischen Eigenschaften nicht definiert werden können, ist diese Vernetzungsvariante für die Kultivierung tierischer Zellen ungeeignet [38]. Des Weiteren bleiben die thermoreversiblen Eigenschaften des Pluronic® F127 auch nach der chemischen Modifikation erhalten, so dass das FF-Hydrogel zusätzlich zur irreversiblen Polymerisierung auch reversibel durch eine Temperaturänderung auf 37 °C vernetzt werden kann. Die kritische Gelierungstemperatur (KGT) wird durch die Polymer- und Proteinkonzentration beeinflusst [41]. In Abbildung 3.6 sind die möglichen Vernetzungsvarianten beider Fibrinogen-basierten Hydrogele gezeigt.

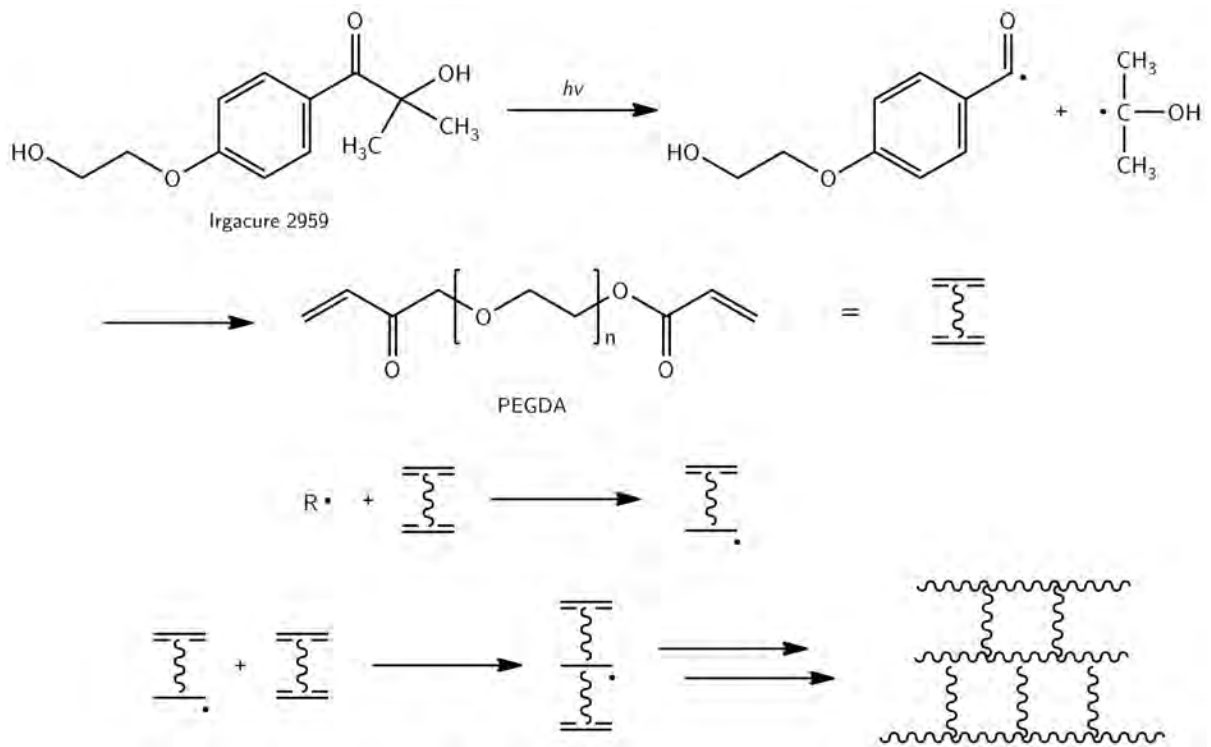


Abbildung 3.5 Reaktionsmechanismus der radikalischen Polymerisation des PF-Hydrogels: Der Photoinitiator Irgacure[®] 2959 dissoziiert durch UV-Licht. Die freien Radikale aktivieren PEGDA-Monomere, die untereinander kovalente Bindungen eingehen und ein solides Hydrogelnetzwerk ausbilden [44].

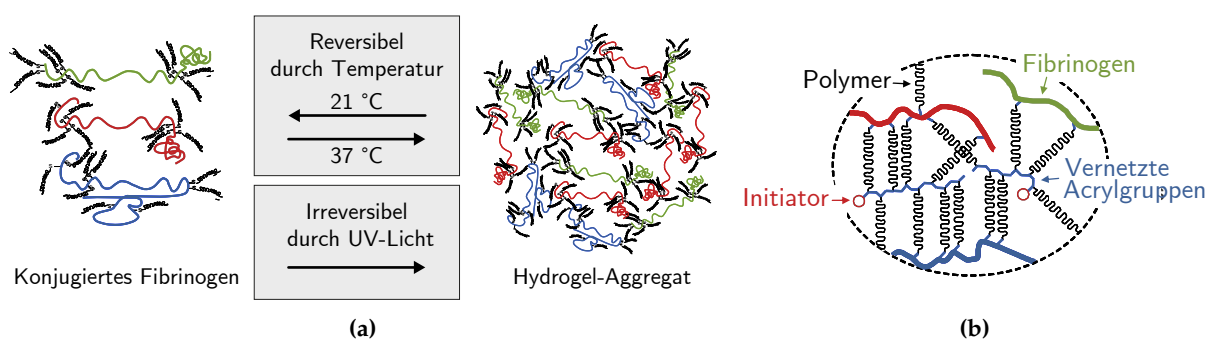


Abbildung 3.6 (a) Vernetzungsvarianten der Fibrinogen-basierten Hydrogele: Während das FF-Hydrogel durch Temperaturänderung reversibel und irreversibel durch UV-Licht vernetzt werden kann, lässt sich das PF-Hydrogel nur irreversibel durch UV-Licht polymerisieren. (b) Detaillierte Illustration des Hydrogelnetzwerkes nach der UV-aktivierten radikalischen Polymerisation [41].

3.3 Anwendungsbereiche von Hydrogelen

Die vielseitigen chemischen und physikalischen Eigenschaften machen Hydrogele zu idealen Materialien für die Biomedizin und die medizinische Forschung. Daraus resultiert ein großes Anwendungsgebiet der Hydrogele, das sich in zwei Kategorien einteilen lässt.

***in vitro* Applikationen** Die grundlegende Erforschung zellulärer Wechselwirkungen in einer dreidimensionalen *in vitro* Umgebung, sowohl auf biochemischer als auch auf molekularbiologischer Ebene, ist die Basis für die Entwicklung diagnostischer Tests und die Durchführung von Studien. Dabei werden zum Beispiel Wirkstoff- und Zytotoxizitätsuntersuchungen sowie Studien zu Stammzellendifferenzierungen durchgeführt oder der Einfluss biochemisch relevanter Moleküle auf die Zellen untersucht. Auch die Optimierung und Weiterentwicklung von Hydrogelen für unterschiedliche Zelltypen zählt zu den *in vitro* Anwendungen. Die Untersuchungen stellen daher meistens die Grundlagen für *in vivo* Anwendungen dar.

***in vivo* Applikationen** Hierbei besteht das Ziel in der Transplantation von künstlich erzeugtem Gewebe (Tissue Engineering), um beispielsweise geschädigte Haut zu ersetzen oder zu regenerieren. Der Fokus liegt dabei auch auf der Entwicklung von Knochen, Knorpeln, Sehnen und Gefäßen. Um solche Strukturen aus Hydrogelen herstellen zu können, stehen verschiedene Bioprinting-Verfahren wie zum Beispiel Rapid Prototyping [46] oder die 2-Photonenpolymerisation [47] zur Verfügung, die stetig weiterentwickelt werden [48]. Die Technologien sind hochflexibel, so dass Konstrukte nach den individuellen Bedürfnissen gefertigt werden können. Die Schwierigkeit besteht jedoch darin, Konstrukte mit ausreichender Stabilität herzustellen. Auch die Komplexität einiger Gewebe, wie die Vielzahl unterschiedlicher dreidimensionaler Strukturen und Zelltypen, stellt eine große Herausforderung dar [49].

Darüber hinaus können bioaktive Moleküle oder Zellen, die *in vivo* kontrolliert Wirkstoffe freisetzen, in Hydrogelen verkapselt werden (drug delivery). Die meisten hochmolekularen Wirkstoffe werden Patienten derzeit noch unverkapselt systemisch, oral oder intravenös, verabreicht [50]. Aufgrund der unspezifischen Aufnahme durch andere Gewebe und dem enzymatischen Abbau der bioaktiven Stoffe sind hohe Dosen notwendig, um die gewünschte lokale Wirkung zu erreichen. Hohe Wirkstoffkonzentrationen können jedoch zu schwerwiegenden Nebenwirkungen bis hin zum Wachstum von Tumoren führen [51]. So können bioaktive Moleküle für einen Gewebetyp nützlich oder gar notwendig sein, während sie für einen anderen Gewebetyp toxisch sein können [22]. Es ist daher von Vorteil, Wirkstoffe durch die Verkapselung in Hydrogelen an einer spezifischen Position im Gewebe zu verabreichen, wo sie anschließend kontrolliert freigesetzt werden können.

Ein weiterer Anwendungsbereich, bei dem Hydrogele zukünftig eine wesentliche Rolle spielen könnten, ist die Behandlung von Krankheiten wie beispielsweise Diabetes, Hämophilie, Krebserkrankungen oder Nierenversagen durch den Einsatz von Stammzelltherapien. In der

klinischen Praxis werden bisher lediglich hämatopoetische Stammzellen routinemäßig zur Behandlung von Leukämien transplantiert. Allerdings würden Zelltherapien mit pluripotenten oder multipotenten Stammzellen voraussichtlich ein noch größeres Potential und vielfältigere Behandlungsmöglichkeiten aufweisen. Um keine Immunabstoßungsreaktionen hervorzurufen, müssen für die Transplantation autologe Zellen verwendet werden. Dies bedeutet, dass dem Patienten vor der Behandlung Stammzellen entnommen werden, diese *in vitro* expandiert und differenziert werden, um sie anschließend dem Patienten zu transplantieren. Für die Vermarktung von Stammzelltherapien ist die Produktion einer ausreichenden Zellpopulation jedoch eine der schwierigsten Aufgaben. Pro Zelltherapie sind in der Regel mehrere Millionen Zellen erforderlich, die durch konventionelle 2D Kultivierungen nicht produziert werden können [52]. Demzufolge ist es notwendig neue, effiziente und reproduzierbare Verfahren zu entwickeln.

Für eine großtechnische Produktion sind gerührte Bioreaktoren stets vorzuziehen, da im Labormaßstab etablierte Kultivierungsbedingungen häufig mit geringem Aufwand auf größere Volumina übertragen werden können. Es ist jedoch nicht möglich alle Zelltypen an Suspension zu adaptieren. Eine Möglichkeit das Wachstum adhärenter Stammzellen in Suspensionsreaktoren zu ermöglichen ist die Verwendung von Mikrocarriern (synthetische Scaffolds). Die kugelförmigen, mikroporösen Partikel werden durch Rühren oder andere Mischtechniken in Suspension gehalten und bieten den Zellen aufgrund eines günstigen Verhältnisses von Partikeloberfläche zu Partikelvolumen eine deutlich vergrößerte Oberfläche in einem relativ geringen Reaktorvolumen. Allerdings üben Mikrocarrier in gerührten Systemen hohe mechanische Belastungen auf die Zellen aus und sind daher für die Kultivierung von Stammzellen ungeeignet [53]. Der Einsatz von Hydrogel-Mikropartikeln weist hingegen mehrere Vorteile auf.

3.4 Mikropartikel zur Verkapselung von Zellen

Die Verkapselung von Zellen in biokompatiblen Hydrogel-Mikropartikeln stellt eine ideale Lösung dar, das Wachstum adhärenter Zellen in Suspensionsreaktoren ohne mechanische Belastung zu ermöglichen. Die Hydrogelstruktur bietet eine optimale Stabilität und schützt die Zellen vor Scherkräften und Kollisionen. Außerdem gewährleistet das Polymernetzwerk den Transport von Nährstoffen und Abfallprodukten sowie Signalmolekülen zur Zellstimulation [53]. Die Vorteile der Kultivierung von Hydrogel-Mikropartikeln sind in Abbildung 3.7 illustriert. Der wirtschaftliche Vorteil kann durch ein einfaches Beispiel veranschaulicht werden. So stellt ein 2 Liter Bioreaktor, der mit 60 % Mikropartikel mit einem Durchmesser von 400 μm betrieben wird, bereits eine Kultivierungsoberfläche von 180 m^2 zur Verfügung. Dies entspricht mehr als 1000 Gewebekulturflaschen, die jeweils eine Oberfläche von 175 cm^2 aufweisen. Für diese große Anzahl an Gewebekulturflaschen würden über 10 Inkubatoren (Laborstandardmaß) benötigt, ganz abgesehen von dem hohen personellen Kosten die notwendig wären, um die Kulturflaschen zu füllen und die Zellen nach der Kultivierung zurückzugewinnen. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass die Zellen nicht nur auf der Oberfläche der Hydrogel-Mikropartikel,

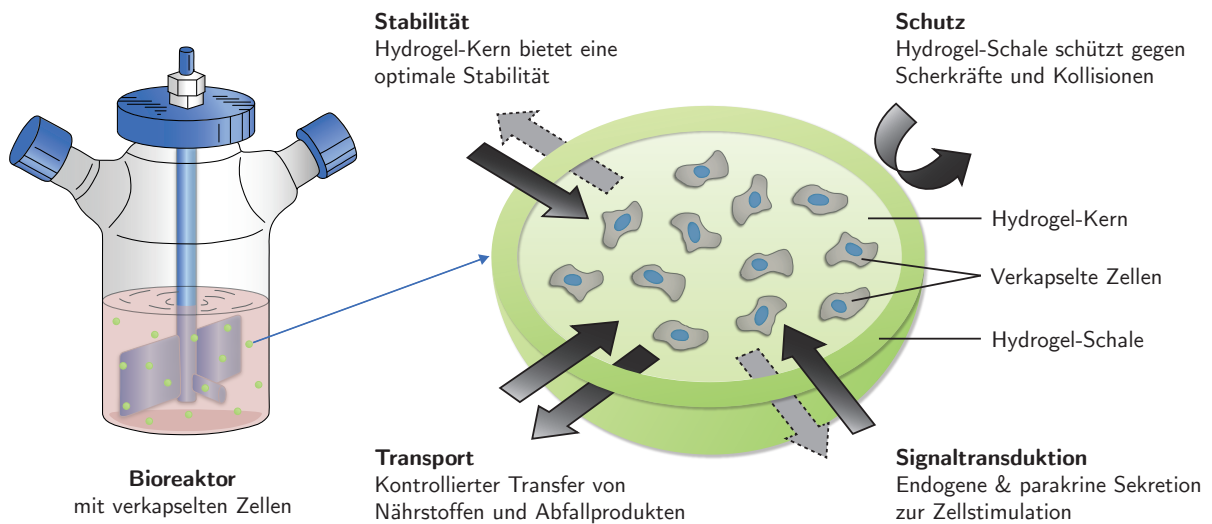


Abbildung 3.7 Hydrogel-Mikropartikel zur Kultivierung tierischer Zellen in gerührten Bioreaktoren [53].

sondern bevorzugt im Inneren der Partikel wachsen. Dies steigert das Kultivierungsvermögen noch einmal um ein Vielfaches.

Eine der bedeutendsten Methoden ist die Herstellung von Mikropartikeln aus Natriumalginat (Na-Alginat). Dabei handelt es sich um ein natürliches, unverzweigtes, anionisches Polymer der Braunalge. Es besteht aus 1-4-glykosidisch verknüpfter α -L-Guluronsäure und β -D-Mannuron-säure, die zu homopolymeren oder heteropolymeren Blockstrukturen ausgebildet sind. Wird Na-Alginat in eine Lösung mit divalenten Kationen, wie zum Beispiel Calcium (Ca^{2+}) oder Barium (Ba^{2+}) eingebracht, wird das an die Carboxylgruppe der Guluronsäure koordinierte Natrium verdrängt. Dies hat eine Gelierung zur Folge, die als ionotrope Gelbildung bezeichnet wird [54]. Die Gelierung wird dabei maßgeblich von der Wechselwirkung des Guluronsäure-Anteils des Na-Alginats mit den divalenten Kationen beeinflusst [55]. Die ionotrope Gelbildung ist ein sehr schnell ablaufender Prozess, so dass bereits durch das Vertropfen einer Na-Alginatlösung in ein Härtingsbad aus Calciumchlorid sofort eine dünne, ionendurchlässige Membran aus Ca-Alginat entsteht. Werden vor dem Gelierungsprozess Zellen in die Na-Alginatlösung eingebracht, können diese in Partikeln verkapselt werden [56]. Die gelierten Partikel werden als Ca-Alginat-Partikel bezeichnet.

Die Herstellung von Mikropartikeln zur Kultivierung tierischer Zellen durch ein technisches Verfahren unterliegt mehreren Anforderungen. Um die Nährstoffversorgung und Sauerstoffdiffusion in den Mikropartikeln zu gewährleisten, dürfen die Mikropartikel einen Durchmesser von 400 μm nicht überschreiten. Die Diffusion ist jedoch auch von der Porosität des Polymernetzwerkes abhängig [57]. Daher kann der Partikeldurchmesser nur als Richtwert verstanden werden und muss individuell angepasst werden. Des Weiteren müssen reproduzierbar uniforme Partikel mit einer geringen Standardabweichung produziert werden, so dass für alle verkapselten Zellen die gleichen Bedingungen bestehen und Kultivierungen miteinander verglichen werden können. Da vitale Zellen verkapselt werden, muss das Herstellungsverfahren sowohl zellschonend als auch unter sterilen Bedingungen durchführbar sein. Außerdem müs-

sen hohe Produktionsraten erreicht werden, um eine ausreichende Menge an Mikropartikeln für die Kultivierung in einem Bioreaktor herstellen zu können.

3.4.1 Tropfenbildende Verfahren zur Herstellung von Mikropartikeln

Zur Herstellung von Ca-Alginat-Partikeln wurde bereits eine Vielzahl technischer Verfahren entwickelt. Dazu gehört die Tropfenbildung durch Gravitation, einen koaxialen Luftstrom, elektrostatische Ladungen, Vibrationen und die Jet Cutter Technologie [58, 59]. Die unterschiedlichen Verfahren sind in Abbildung 3.8 dargestellt.

Die einfachste Methode zur Herstellung von Ca-Alginat-Partikeln ist die Tropfenbildung durch Gravitation. Dazu wird eine Na-Alginatlösung ohne äußeren Einfluss mit einem konstanten Volumenstrom durch eine Düse oder Kanüle geleitet. Dadurch entstehen am Düsenausgang Tropfen, die sich in einem Härtingsbad zu stabilen Partikeln vernetzen. Die Tropfengröße kann allerdings nur durch die Viskosität der Polymerlösung oder den Düsendurchmesser beeinflusst werden. In der Regel lassen sich mit dieser Methode lediglich Partikel mit einem Durchmesser zwischen 2 und 5 mm generieren, so dass diese Methode für die meisten biotechnologischen Anwendungen nicht geeignet ist [56].

Hydrogelpartikel mit einem Durchmesser unter 1 mm können durch die Tropfenbildung mit einem koaxialen Luftstrom generiert werden. Dazu wird ein Luftstrom um die Extrusionsdüse angelegt, der das Abreißen der Tropfen initiiert. Die Tropfengröße kann variiert werden, indem der Luftstrom oder die Flussrate der Polymerlösung verändert wird. Allerdings ist die Flussrate bei dieser Methode auf weniger als 30 mL/h begrenzt. Wird eine höhere Flussrate gewählt, geht die Tropfenbildung in einen kontinuierlichen Flüssigkeitsstrahl über, so dass keine Mikropartikel generiert werden können [60]. Die Technologie ist auch als Flow Focusing[®] bekannt und weist milde Bedingungen auf. Dadurch können Zellen mit hoher Viabilität verkapselt werden [61]. Ein System zur Verkapselung für die biotechnologische Forschung wurde von dem spanischen Unternehmen Ingeniatrix Tecnológicas S.L. entwickelt und wird unter der Bezeichnung Cellena[®] durch Biomedal S.L. vertrieben. Zur Herstellung der Mikropartikel werden sterile Einwegdüsen mit Durchmessern zwischen 200 und 700 µm eingesetzt. Dadurch können laut Hersteller sterile Mikropartikel zwischen 95 und 460 µm produziert werden. Trotz aller Vorteile ist diese Technologie aufgrund der niedrigen Flussrate nicht für den industriellen und nur bedingt für den Labormaßstab geeignet.

Des Weiteren können Mikropartikel durch ein elektrisches Feld generiert werden. Bei diesem Verfahren wird die Polymerlösung mit einem konstantem Volumenstrom durch eine Düse gepumpt. Durch hohe elektrostatische Kräfte zwischen der Düse und dem Härtingsbad können uniforme Tropfen generiert werden. Für die Herstellung der Mikropartikel ist, abhängig vom Düsendurchmesser, eine elektrische Spannung zwischen 6 und 10 kV notwendig. Mit diesem Verfahren können ebenfalls nur geringe Volumenströme zur Partikelproduktion verwendet werden [62, 63].

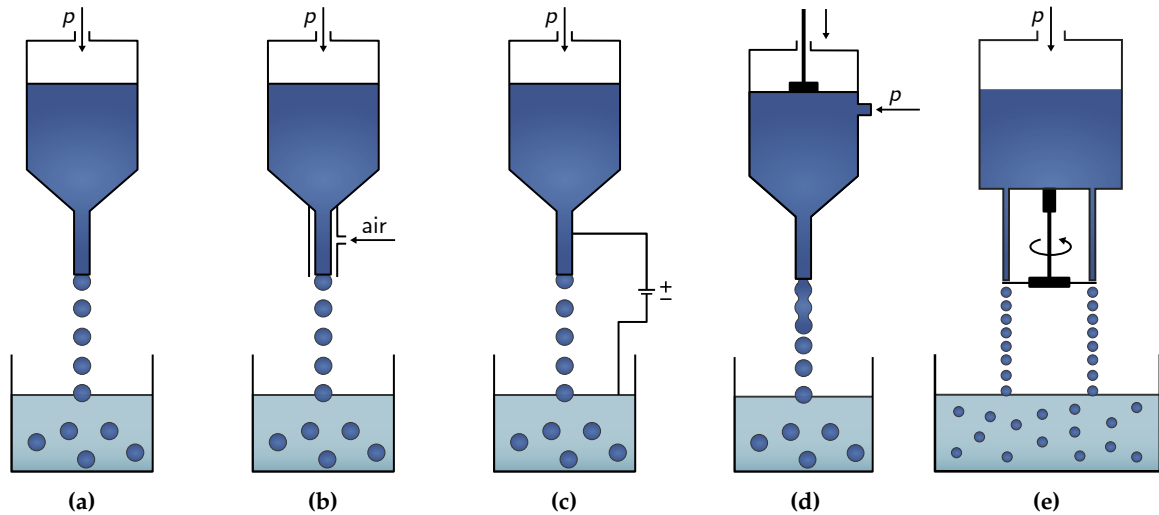


Abbildung 3.8 Schematische Darstellung tropfenbildender Verfahren zur Verkapselung von Zellen: Hydrogelpartikel können durch (a) Gravitationskräfte, (b) einen koaxialen Luftstrom, (c) durch ein elektrostatisches Feld, (d) durch Vibrationen oder (e) die Jet Cutter Technologie hergestellt werden [58].

Die Vibrations-Technologie basiert auf einem laminaren Flüssigkeitsstrahl, der durch mechanische Vibrationen in Tropfen gleicher Größe zerteilt wird. Dabei kann entweder die Polymerlösung oder die Düse selbst in Schwingungen versetzt werden [64]. Die Instabilität eines Flüssigkeitsstrahls wurde theoretisch von Lord Rayleigh analysiert [65]. Er zeigte, dass die Vibrationsfrequenz für einen maximalen Strahlzerfall vom Volumenstrom und Düsendurchmesser abhängig ist. Um eine schmale Größenverteilung der Mikropartikel zu gewährleisten, muss das Verschmelzen von Tropfen während des Falls in das Härterbad vermieden werden. Dies kann mit einer elektrostatischen Dispersionseinheit realisiert werden. Dazu werden die entstandenen Tropfen elektrisch geladen, so dass sie sich abstoßen und an unterschiedlichen Positionen auf der Oberfläche des Härterbades auftreffen. Dies ermöglicht die Herstellung monodisperser Mikropartikel in einem Bereich zwischen 200 μm und 2 mm. Der größte Vorteil der Vibrations-Technologie gegenüber anderen Verfahren ist die relativ einfache Scale-up Möglichkeit [66]. Werden parallel mehrere Düsen eingesetzt kann die Produktionsleistung um ein Vielfaches gesteigert werden, so dass die Produktionsrate 20 bis 40 mal höher ist als das Verfahren mittels koaxialem Luftstrom oder der elektrischen Spannung [58]. Dadurch können Flussraten bis zu 2 L/h erreicht werden, die es ermöglichen eine große Menge an Mikropartikeln in relativ kurzer Zeit unter sterilen Bedingungen zu generieren [67, 68]. Auf diese Weise ist der Scale-up aus dem Labor in den Pilot- oder industriellen Maßstab möglich. Kommerzielle Systeme mit dieser Technologie werden zum Beispiel von der Nisco Engineering AG (Modell VAR D) und Büchi Labortechnik GmbH (Encapsulator B-395) angeboten.

Die Herstellung von Mikropartikeln mittels Jet Cutter Technologie (geniaLab[®] BioTechnologie GmbH) basiert auf der mechanischen Einwirkung eines Schneidedrahtes auf einen laminaren Flüssigkeitsstrahl. Dabei wird der Strahl durch einen mit hoher Geschwindigkeit rotierenden Mikroschneidedraht in zylindrische Segmente zerteilt. Durch die Gravitationskräfte bilden sich die Segmente zu runden Mikropartikeln aus, bevor sie im Härterbad gelieren. Mit dem Ver-

fahren lassen sich ebenfalls Partikel zwischen 200 μm und 2 mm herstellen. Die Partikelgröße ist dabei vom Düsendurchmesser, der Fließgeschwindigkeit, der Anzahl der Schneidedrähte und deren Drehgeschwindigkeit abhängig. Ein Nachteil ist jedoch, dass der Draht durch jeden Schnitt des Flüssigkeitsstrahls einen Schnittverlust produziert. Dies führt zur Bildung sehr viel kleinerer Satellitotropfen [69]. Ähnlich wie bei der Partikelproduktion mittels Vibrations-Technologie können auch beim Jet Cutter Verfahren Mehrfachdüsen verwendet werden, um die Produktivität zu steigern. Aufgrund der Schneidetechnik entfernen sich die Tropfen, insbesondere bei hoher Schnittfrequenz, unterschiedlich weit vom Flüssigkeitsstrahl. Diese führt dazu, dass Tropfen miteinander verschmelzen, bevor sie in das Härtingsbad eintauchen. Somit können mit dieser Technologie, bei hohen Produktionsraten, keine monodispersen Mikropartikel hergestellt werden [56].

Mikrofluidische Systeme sind eine weitere Möglichkeit zur Herstellung von Mikropartikeln. Dabei handelt es sich um eine miniaturistische Technologie, die auch unter dem Begriff Lab-on-a-Chip bekannt ist. Mit Hilfe von Mikrokanalstrukturen, die in Quarzglas oder Kunststoffen eingelassen sind, können Partikel zwischen 10 und 200 μm erzeugt werden. Die Partikel können durch zwei ineinanderlaufende Mikrokanäle oder mit einer Y- oder T-Verzweigung generiert werden. Dazu wird im Hauptkanal eine kontinuierliche Strömung erzeugt, die zur Gelierung der Polymerlösung führt, während die Polymerlösung durch einen weiteren Mikrokanal geleitet wird [70, 71]. Aufgrund der geringen Produktionsrate ist das System jedoch nicht für größere Volumina geeignet. Durch verschiedene Module bietet es allerdings eine Vielzahl an Möglichkeiten zur Herstellung von Mikropartikeln. Komplette mikrofluidische Systeme als auch maßgeschneiderte Lösungen werden von Dolomite Microfluidics Ltd. angeboten.

Mikropartikel und Core-Shell-Mikropartikel Mit einigen Verfahren, wie der Flow Focusing[®] Technologie [72], der Vibrationstechnik [73] oder mit mikrofluidischen Systemen [74] können zwei Arten von Mikropartikeln erzeugt werden. Es können Mikropartikel hergestellt werden, die aus einem Polymer wie zum Beispiel Na-Alginat, PVA oder Cellulosesulfat bestehen. Diese Polymerlösungen können durch einen schnellen Gelierungsprozess vernetzt werden (Abb. 3.9a).

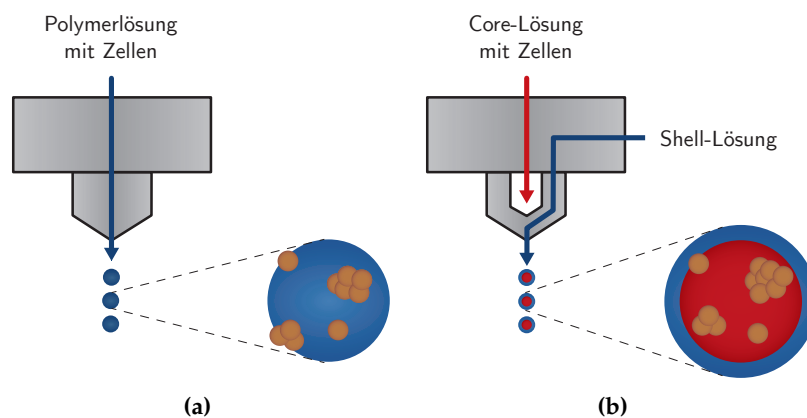


Abbildung 3.9 Herstellung und Aufbau von (a) Mikropartikeln und (b) Core-Shell-Mikrokapseln [75].

Die bisher entwickelten zellfördernden Hydrogele, die die Zelladhäsion ermöglichen, benötigen zur vollständigen Vernetzung mehrere Minuten. Da die Fallzeit der Mikropartikel zum Beispiel bei der Herstellung mittels Encapsulator jedoch weniger als 300 ms beträgt, können die Tropfen aus zellfördernden Hydrogelen in dieser Zeit nicht vernetzt werden, so dass keine Mikropartikel hergestellt werden können. Um die Kultivierung von Zellen in zellfördernden Hydrogel-Mikropartikel dennoch zu ermöglichen, können Core-Shell-Mikrokapseln mit einer festen Hydrogel-Schale und einem flüssigen oder festen Kernbereich generiert werden. Dabei dienen Polymerlösungen, die eine schnelle Vernetzung eingehen als Shell-Flüssigkeit und sorgen für die notwendige mechanische Stabilität der Mikropartikel. Als Core-Materialien können zellfördernde Hydrogele verwendet werden (Abb. 3.9b). Core-Shell-Mikrokapseln stellen somit eine Möglichkeit dar, adhärent wachsende Zellen in Suspensionsreaktoren zu expandieren und für *in vitro* Studien bereitzustellen [76]. Ebenso ist die Produktion großer Mengen Stammzellen für Zelltherapien auf diese Weise denkbar.

4 Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein System zur Herstellung von Hydrogel-Mikropartikeln, der Encapsulator B-395 Pro, charakterisiert. Zunächst wird die Funktionsweise erläutert und der Einfluss unterschiedlicher Parameter auf die Partikelproduktion analysiert. In diesem Zusammenhang wurden die Hydrogele rheologisch charakterisiert und die Auswirkungen verschiedener Vernetzungsvarianten auf die Festigkeit der Hydrogele aufgezeigt. Ferner wurden Hefezellen als Modellorganismus in Mikropartikeln verkapselt und kultiviert. Dabei wurde eine bildbasierte Analysenmethode zur Detektion von Mikropartikeln und Zellclustern erprobt. Außerdem wurden verschiedene immortalisierte Zelllinien und MSC in soliden 3D Fibrinogen-basierten Hydrogelen kultiviert und deren Zellwachstum eingehend untersucht.

4.1 Charakterisierung des Encapsulators B-395 Pro

4.1.1 Aufbau und Funktionsweise des Encapsulators

Der Encapsulator B-395 Pro (Büchi Labortechnik GmbH) dient zur Verkapselung von organischen Materialien, wie Zellen, Enzymen oder Wirkstoffen in Biopolymer-Mikropartikel. Als Biopolymermatrix steht eine große Vielfalt an Polymeren, wie beispielsweise Lösungen aus Na-Alginat, Carrageen oder Cellulosesulfat zur Verfügung.

Der Encapsulator B-395 Pro initiiert die Herstellung gleich großer Mikropartikel durch Vibrationen. Der Aufbau des Encapsulators ist in Abbildung 4.1a dargestellt, während über Abbildung 4.1b ein Video abgerufen werden kann, das den Encapsulator in Betrieb zeigt. Zur Herstellung von Mikropartikeln wird die Polymerlösung zunächst mit einer Spritzenpumpe oder mit Luftdruck durch eine Düse mit definiertem Durchmesser gefördert und ein laminarer Flüssigkeitsstrahl erzeugt. Durch überlagerte, sinusförmige Schwingungen, die von der Vibrationseinheit generiert werden, wird der laminare Strahl in Tropfen gleicher Größe zerteilt. Anschließend fallen die Tropfen durch ein elektrisch geladenes Feld zwischen Düse und Elektrode, wodurch die Oberfläche der Tropfen geladen wird. Elektrostatische Abstoßungen verteilen die Mikropartikel kegelförmig bevor sie schließlich in das Härtingsbad eintauchen und gelieren. Zur Online-Visualisierung dient eine Stroboskoplampe, die im Hintergrund des Flüssigkeitsstrahls angebracht ist. So können einzelne Mikropartikel erkannt und die Tropfenproduktion eingestellt werden. Optimale Parameter sind erreicht, wenn eine stehende Kette aus einzelnen Tropfen deutlich zu erkennen ist. Dies ist in den Detailaufnahmen in Abbildung 4.2

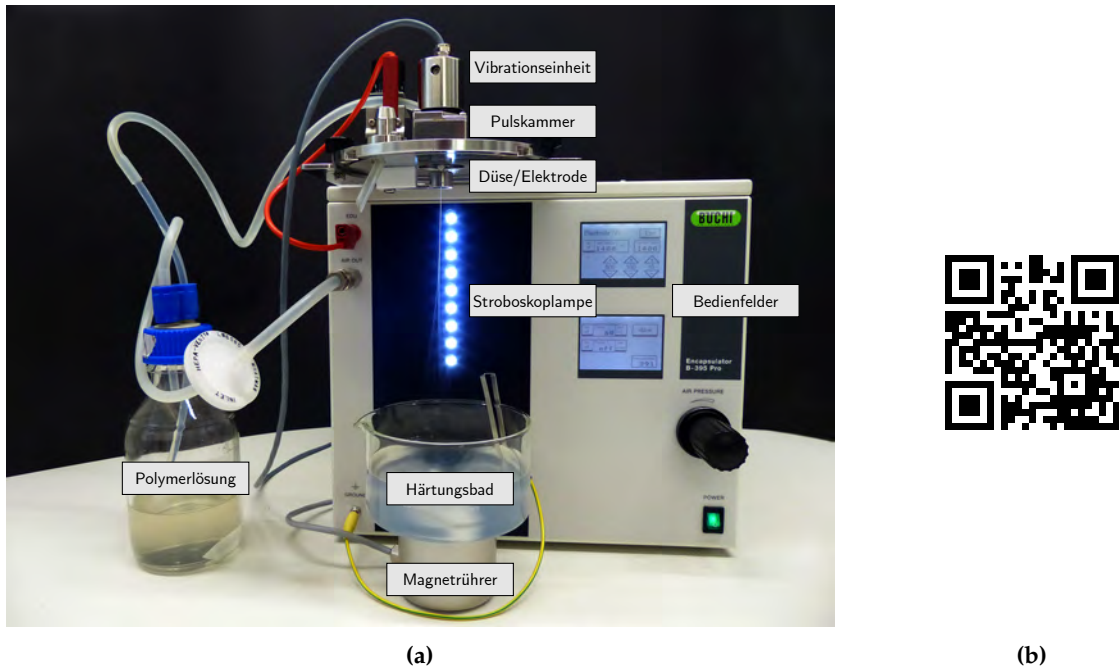


Abbildung 4.1 (a) Frontansicht des Encapsulator B-395 Pro: Die Polymerlösung wird über eine Druckflasche bzw. eine Spritzenpumpe zur Pulsammer gefördert. Durch Vibrationen entstehen an der Düse Tropfen, die durch eine Elektrode geladen und kegelförmig verteilt werden, bevor sie im Härtingsbad gelieren. (b) QR-Code zum Video des Encapsulators in Betrieb. Die Internetadressen der QR-Codes sind in Anhang B.7 aufgeführt.

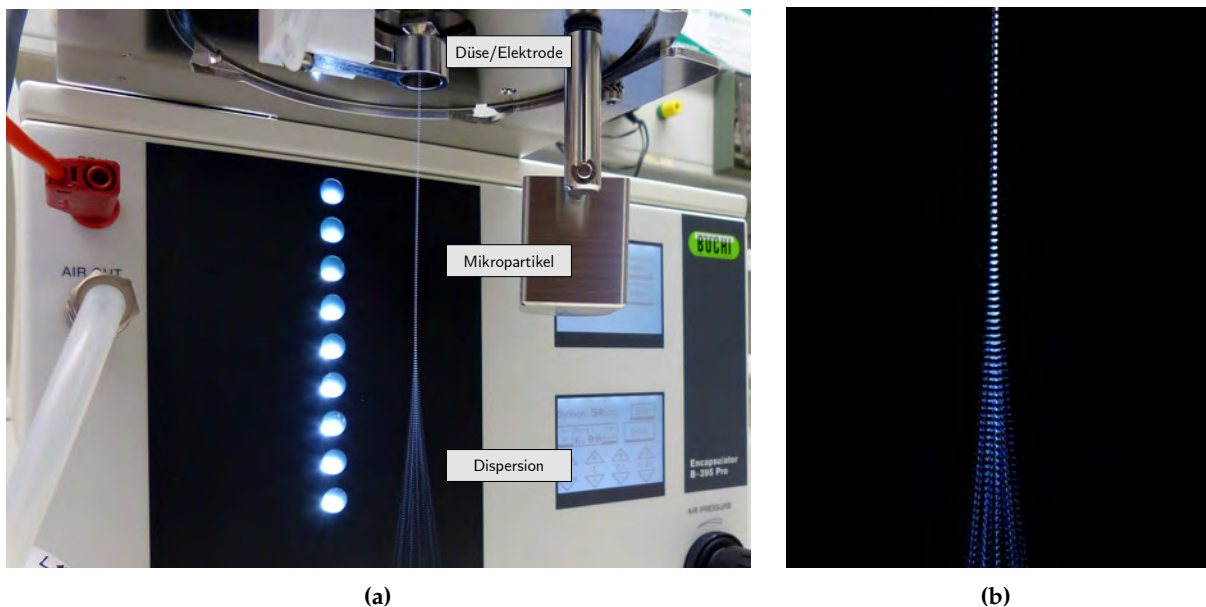


Abbildung 4.2 Detailansicht des Encapsulator B-395 Pro: (a) Produktion von Mikropartikeln und (b) Kette einzelner Tropfen sowie die kegelförmige Verteilung der Mikropartikel.

zu sehen. Durch die Kombination aus überlagerten Vibrationen und elektrostatischer Ladung kann das Verschmelzen einzelner Tropfen verhindert werden, so dass letztendlich Mikropartikel gleicher Größe generiert werden können.

Prinzipiell lassen sich mit dem Encapsulator zwei Arten von Mikropartikeln herstellen, deren Unterschiede bereits in Abschnitt 3.4.1 erläutert wurden. Mit dem Einzeldüsensystem können kugelförmige Mikropartikel erzeugt werden. Core-Shell-Mikrokapseln hingegen werden mit einem konzentrischen Düsensystem ebenfalls in einem Ein-Schritt-Verfahren generiert. Zur Herstellung von Core-Shell-Mikrokapseln wird eine Shell-Düse auf eine Core-Düse (Einzeldüsensystem) gesteckt und mit Schrauben an der Pulschammer fixiert. Auf die Pulschammer wird anschließend eine Membran montiert, die die Vibrationen auf die Flüssigkeit überträgt. Dazu stehen eine Glasfaser verstärkte PTFE- sowie eine Edelstahlmembran (Prototyp) zur Verfügung. In Abbildung 4.3 sind exemplarisch die zwei Düsentypen, die unterschiedlichen Pulschammern zur Produktion der Mikropartikel und die Membranen gezeigt.

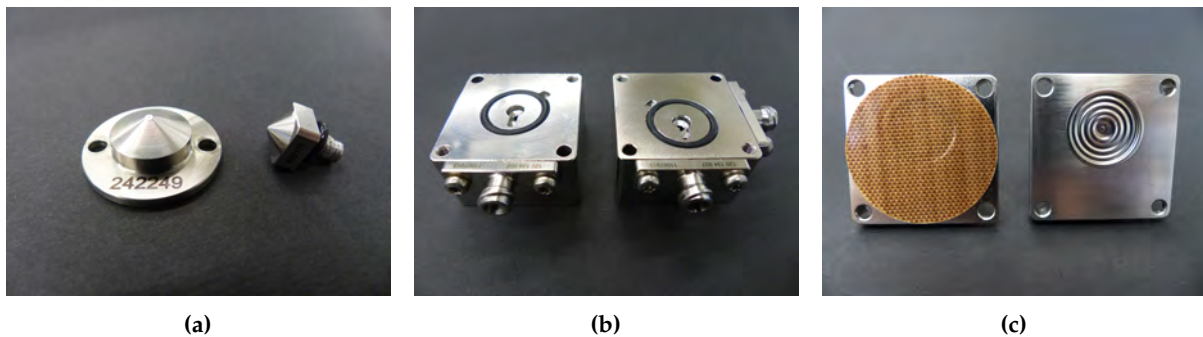


Abbildung 4.3 Einzelne Bestandteile zur Herstellung von Partikeln: (a) Shell- und Core-Düse, (b) Pulschammern zur Herstellung von Mikropartikeln und Core-Shell-Mikrokapseln und (c) PTFE- und Edelstahlmembran.

Bei der Herstellung von Mikropartikeln kann zwischen zwei System gewählt werden, um die Polymerlösung zu fördern. Die Spritzenpumpe wird vor allem für Volumina < 60 mL verwendet und wenn die Flussrate exakt gesteuert werden muss. Die Förderung mittels Luftdruck ist hingegen für große Volumina > 60 mL geeignet sowie zur Produktion größerer Mikropartikel, bei der hohe Flussraten nötig sind. Dies ist bei der Verwendung von Düsendurchmessern > 300 μm der Fall. Wird das konzentrische Düsensystem zur Herstellung von Core-Shell-Mikrokapseln verwendet, werden beide Systeme gleichzeitig betrieben. Die Core-Flüssigkeit wird dabei mit der Spritzenpumpe und die Shell-Flüssigkeit mit Luftdruck gefördert. Somit kann die Größe der Cores exakt eingestellt werden. Des Weiteren lässt sich jede Spritzengröße (10 mL bis 60 mL) für eine akkurate Flussrate individuell über eine integrierte Methode kalibrieren. Die Größe der Mikropartikel wird neben der Flussrate noch durch weitere Parameter beeinflusst. Dazu zählen neben dem Düsendurchmesser auch die Vibrationsfrequenz und deren Amplitude sowie die physikalischen Fließeigenschaften der Polymerlösungen (Viskosität). Zur Herstellung unterschiedlicher Mikropartikelgrößen stehen acht Einzeldüsen mit Durchmessern von 80 μm bis 1000 μm zur Verfügung. Die Shell-Düsen reichen von 200 μm bis 900 μm . Außerdem kann die Vibrationsfrequenz zwischen 40 Hz und 6000 Hz und die Intensität der Vibration (Amplitu-

Tabelle 4.1 Veränderbare Parameter des Encapsulator B-395 Pro

Parameter	Betriebsbereich
Durchmesser Düse (Core)	0,08; 0,12; 0,15; 0,2; 0,3; 0,45; 0,75 und 1,0 mm
Durchmesser Düse (Shell)	0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 und 0,9 mm
Vibrationsfrequenz	40 - 6000 Hz
Spannung der Elektrode	250 - 2500 V
Amplitude (Intensität)	1 - 12
Flussrate (Spritzenpumpe)	0,01 - 40 mL/min
Flussrate (Luftdruck)	0,5 - 200 mL/min

de) zwischen 1 und 12 gewählt werden. Die Spannung zur Verteilung der Tropfen kann von 250 V bis 2500 V variiert werden. Alle veränderbaren Parameter können über zwei Bedienfelder eingestellt werden, deren Betriebsbereiche in Tabelle 4.1 zusammengefasst sind.

Für die Verkapselung von lebenden Zellen, im Folgenden auch als Immobilisierung bezeichnet, ist steriles Arbeiten unumgänglich. Daher sind alle Bauteile des Encapsulators, die im direkten Kontakt mit der Polymerlösung stehen, aus Edelstahl gefertigt und autoklavierbar. Dazu gehören die Pulsammern, die Düsen und die Elektrode. Mit Hilfe eines autoklavierbaren 2 L Reaktionsgefäßes können außerdem große Mengen an Mikropartikeln unter vollständig abgeschirmten Bedingungen produziert werden, so dass das System auch in einen GMP-Prozess integriert werden kann.

Eine weit verbreitete Methode ist die Herstellung von Mikropartikeln via ionotroper Gelbildung, zum Beispiel durch Vertropfen einer Na-Alginatlösung in eine CaCl_2 -Lösung. Na-Alginat können mit unterschiedlichen Viskositätsangaben und Reinheitsstufen von Herstellern bezogen werden. Dabei ist die Viskosität einer Na-Alginatlösung sowohl von der Polymerkettenlänge als auch ihrer Konzentration abhängig. Je nach Viskosität ist ein unterschiedlicher Druck erforderlich, um die Polymerlösung durch die Düse des Encapsulators zu fördern und muss daher bei der Herstellung von Mikropartikeln an den Düsendurchmesser angepasst werden.

Die Viskositätsfunktionen verschiedener Na-Alginatlösungen werden in Abschnitt 4.2.2 im Detail vorgestellt und in Bezug auf die Mikropartikelherstellung mittels Encapsulator diskutiert. Im Allgemeinen eignen sich jedoch niederviskose Na-Alginatlösungen zwischen 80 und 600 mPa·s aufgrund der Fließeigenschaften am besten zur Produktion von Mikropartikeln mit einem Durchmesser $< 500 \mu\text{m}$. Daher wurden alle Experimente zur Charakterisierung des Encapsulators mit einer unsterilen, zellfreien 1,5 % (w/v) Na-Alginatlösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 71 238) und 0,1 M Calciumchlorid-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, C7902) durchgeführt. Die ermittelten Konzentrations- und Viskositätsbereiche für verschiedene Düsendurchmesser sind in Tabelle 4.2 dargestellt.

Zur Charakterisierung des Encapsulators wurden Mikropartikel und Core-Shell-Mikrokapseln mit verschiedenen Düsendurchmessern und Parametern hergestellt. Dabei wurde der Einfluss

Tabelle 4.2 Konzentrations- und Viskositätsbereiche von Na-Alginatlösungen für verschiedene Düsendurchmesser

Düsendurchmesser	Konzentrationsbereich	Viskositätsbereich
80 - 200 μm	0,8 - 1,5 %	79,8 - 453 mPa·s
120 - 200 μm	1,0 - 1,6 %	143 - 548 mPa·s
200 - 300 μm	1,2 - 1,8 %	238 - 781 mPa·s
300 - 500 μm	1,7 - 2,5 %	657 - 2210 mPa·s

der Vibrationsfrequenz sowie der Flussrate auf die Mikropartikelgröße untersucht. Außerdem wurden die Betriebskennfelder für die Düsen mit einem Durchmesser von 80 bis 200 μm ermittelt. Die Auswertung der Partikeldurchmesser erfolgte mit einer bildverarbeitenden Software, deren Prozessschritte zunächst erläutert werden.

4.1.2 Auswertung der Mikropartikel mittels Bildverarbeitung

Die Auswertung der Mikropartikel erfolgte anhand mikroskopischer Bilder mit einer speziell für die Mikropartikel angepassten Software (Graphic Analyzer). Diese wurde am hiesigen Institut im Arbeitskreis von Dr. Patrick Lindner von Christian Lüder entwickelt. Mit der Software kann innerhalb kurzer Zeit eine repräsentative Stichprobe untersucht und eine statistisch abgesicherte Größenverteilung der Partikel aufgestellt werden. Der Graphic Analyzer beruht auf einem bildverarbeitenden Algorithmus der morphologische Eigenschaften von Bildobjekten erkennt. Die einzelnen Schritte des Algorithmus sind in Abbildung 4.4 dargestellt.

Zur Begrenzung der Bildinformation wird das Farbbild (Abb. 4.4a) zunächst in ein Graustufenbild konvertiert (Abb. 4.4b). Die Intensitätswerte der einzelnen Pixel werden auf einen vorgegebenen Wertebereich ausgedehnt, um ein möglichst breites Spektrum an Grauwerten zu erhalten. Im nächsten Schritt wird die Kantendetektion nach Canny durchgeführt, um die Kanten der Mikropartikel zu detektieren (Abb. 4.4c). Bildpunkte, die nicht zu den Kanten der Mikropartikeln gehören, werden anschließend mit einem weiteren Verfahren, dem Threshold nach Otsu, entfernt. Dabei werden alle Bildpunkte entfernt, die im Vergleich zu den intensivsten Objekten schwache Grauwerte aufweisen. Das Ergebnis ist ein Binärbild, bei dem neben dem Hintergrund nur die intensiven Kanten vorhanden sind. Da bei dem Threshold nicht unterschieden wird, ob eine Kante zu einem Mikropartikel gehört, können auch Kanten von gesuchten Objekten durch das Verfahren entfernt werden. Geschlossene Objekte werden schließlich durch morphologische Operationen wie das Closing erreicht (Abb. 4.4d), so dass die Mikropartikel detektiert werden können. Nicht vollständig geschlossene Objekte können in der Auswertung nicht berücksichtigt werden (Abb. 4.4e). Das Ergebnisbild zeigt das Mikroskopbild in dem die detektierten Mikropartikel farblich markiert sind (Abb. 4.4f). Die Daten über die Position, Exzentrizität und Pixelgröße werden in einer Tabelle ausgegeben. Darüber hinaus kann, basierend auf der Annahme, dass es sich bei den Mikropartikeln um ideale Kugeln handelt, der Durchmesser sowie das Volumen der Mikropartikel bestimmt werden [77].

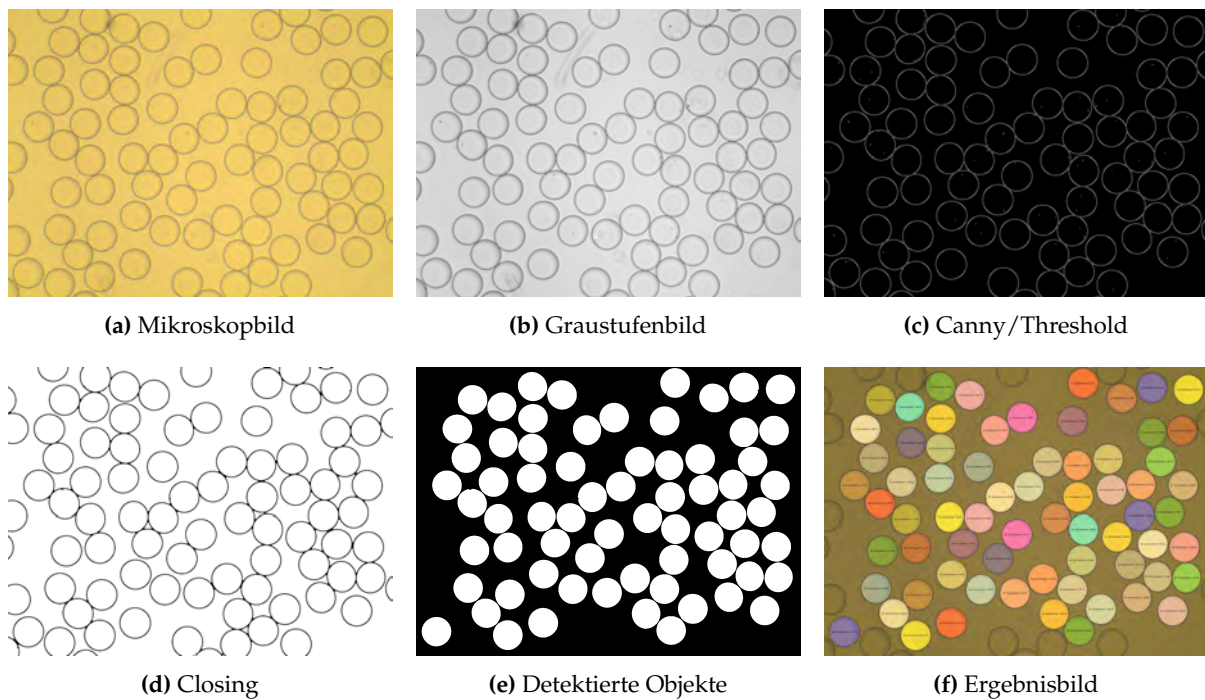


Abbildung 4.4 Prozessschritte des Algorithmus zur Auswertung von Mikropartikeln.

4.1.3 Herstellung und Charakterisierung von Mikropartikeln

Um den Produktionsbereich des Encapsulators zur Herstellung von Mikropartikeln zu skizzieren, wurden die Düsen mit den Durchmessern $80\ \mu\text{m}$, $120\ \mu\text{m}$, $150\ \mu\text{m}$ und $200\ \mu\text{m}$ zur Partikelproduktion herangezogen. Das entspricht den Düsen, mit denen sich bei Verwendung einer 1,5 % Na-Alginatlösung Mikropartikel herstellen lassen (Tab. 4.2). Die Tropfenbildung wird dabei vom Düsendurchmesser, der Vibrationsfrequenz und der Flussrate (Volumenstrom) beeinflusst. Da der Düsendurchmesser definiert ist, lässt sich aus den übrigen Parametern ein Betriebskennfeld aufstellen, das es erlaubt den Bereich des optimalen Strahlzerfalls anzugeben.

Das Betriebskennfeld zur Herstellung monodisperser Tropfen wird von Bereichen begrenzt in denen aufgrund (a) eines zu geringen Volumenstroms kein Flüssigkeitsstrahl entsteht, (b) ein zu hoher Volumenstrom einen welligen Strahl verursacht, (c) eine zu geringe Vibrationsfrequenz zur Bildung von Satellitentropfen führt und (d) eine zu hohe Frequenz einen unregelmäßigen Strahlzerfall bewirkt [79]. Eine schematische Darstellung sowie die ermittelten Betriebskennfelder für die Düsendurchmesser $80\ \mu\text{m}$ bis $200\ \mu\text{m}$ sind in Abbildung 4.5 dargestellt. Die farblich hinterlegten Bereiche sind mögliche Betriebspunkte, in denen monodisperse Tropfen generiert werden können.

Auf der Grundlage der Betriebskennfelder wurden Mikropartikel mit den verschiedenen Düsendurchmessern bei konstanter Frequenz von $1500\ \text{Hz}$ hergestellt. Die Flussrate wurde gemäß der Betriebskennfelder entsprechend angepasst, wobei jeweils die geringste Flussrate verwendet wurde, bei der ein laminarer Flüssigkeitsstrahl beobachtet werden konnte. Die Mikropartikel

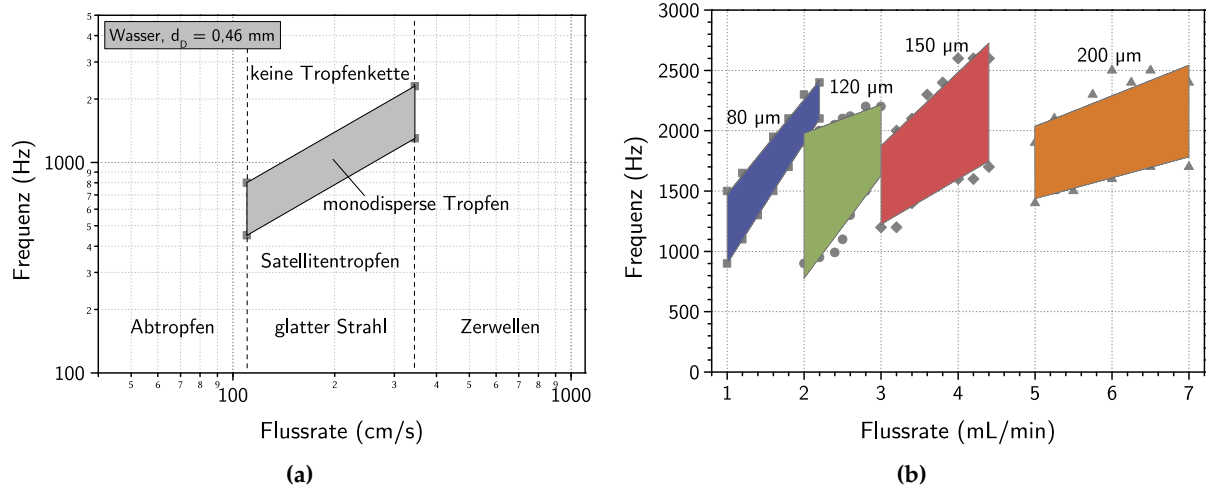


Abbildung 4.5 (a) Schematische Darstellung des Betriebskennfeldes nach Sakai *et al.* [78]. (b) Betriebskennfelder einer 1,5 % Na-Alginatlösung für Düsendurchmesser von 80 μm bis 200 μm in Abhängigkeit der Vibrationsfrequenz und der Flussrate bei konstanter Amplitude. Die farblich hinterlegten Bereiche sind mögliche Betriebspunkte.

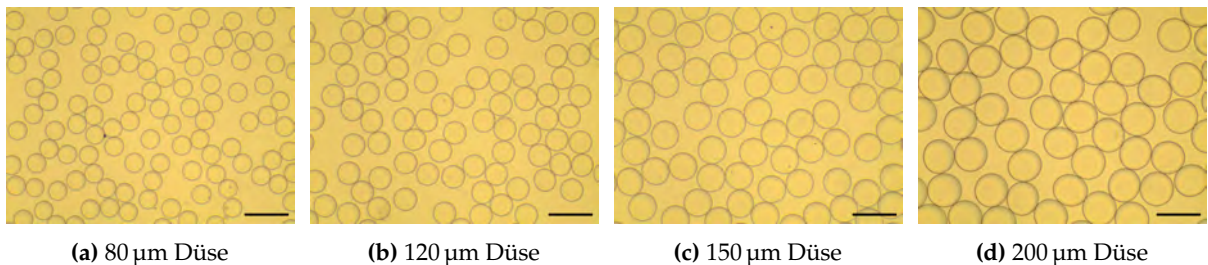


Abbildung 4.6 Ca-Alginat-Mikropartikel produziert mit unterschiedlichen Düsendurchmessern bei 1500 Hz und angepasster Flussrate, Messbalken: 500 μm . (a) $\dot{V} = 1,2 \text{ mL/min}$, (b) $\dot{V} = 2,0 \text{ mL/min}$, (c) $\dot{V} = 3,0 \text{ mL/min}$, (d) $\dot{V} = 5,0 \text{ mL/min}$.

und deren Parameter sind in Abbildung 4.6 dargestellt. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen können bereits optisch deutliche Unterschiede im Partikeldurchmesser festgestellt werden. Um jedoch quantitative Aussagen über die Partikelgröße treffen zu können, wurde der mittlere Durchmesser über einen bildverarbeitenden Algorithmus ermittelt und jeweils Größenverteilungen der Mikropartikel aufgestellt. Zur Auswertung wurden mindestens 370 Stichproben herangezogen.

In Abbildung 4.7 sind die mittleren Partikeldurchmesser dargestellt. Sie zeigen, dass mit größer werdendem Düsendurchmesser auch der Durchmesser der Mikropartikel steigt. So wiesen die Mikropartikel, die mit der 80 μm Düse hergestellt wurden, einen Durchmesser von 214 μm auf. Der Partikeldurchmesser der 120 μm Düse betrug 261 μm und bei Verwendung der 150 μm Düse wurden Partikel mit einem Durchmesser von 316 μm generiert. Eine durchschnittliche Größe von 385 μm wiesen die Partikel auf, die mit der 200 μm Düse generiert wurden. Wird zur Partikelproduktion eine größere Düse verwendet, können mit einer 1,5 % Na-Alginatlösung aufgrund der geringen Viskosität keine monodispersen Mikropartikel hergestellt werden. Wird jedoch eine höher konzentrierte Na-Alginatlösung verwendet, können mittels Encapsulator auch Mikropartikel $> 500 \mu\text{m}$ generiert werden.

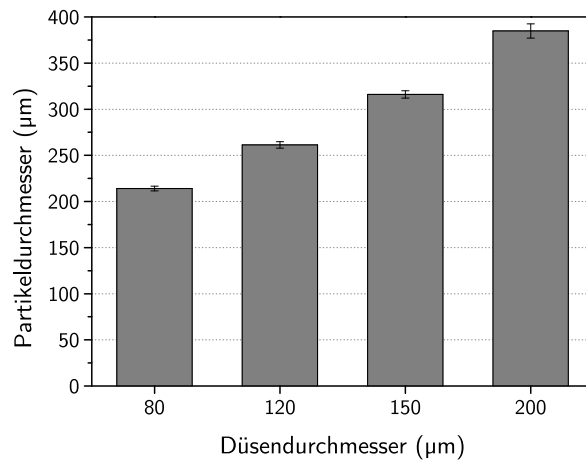


Abbildung 4.7 Einfluss unterschiedlicher Düsengrößen auf den Partikeldurchmesser bei 1500 Hz und angepasster Flussrate: 80 µm Düse, Partikel-Ø = 214 µm, $SD = 1,21\%$; 120 µm Düse, Partikel-Ø = 261 µm, $SD = 1,33\%$; 150 µm Düse, Partikel-Ø = 316 µm, $SD = 1,28\%$; 200 µm Düse, Partikel-Ø = 385 µm, $SD = 2,01\%$.

In Abbildung 4.8 sind die Histogramme der Mikropartikel gezeigt, die mit den vier untersuchten Düsengrößen hergestellt wurden. Dabei ist zu erkennen, dass die Varianz der Mikropartikel mit der Düsengröße zunimmt. Die Mikropartikel, die mit der 80 µm Düse hergestellt wurden, wiesen eine Varianz von $6,67 \mu\text{m}^2$ auf, während mit $59,61 \mu\text{m}^2$ die größte Varianz bei den Mikropartikeln bestimmt wurde, die mit der 200 µm Düse generiert wurden.

Um den Einfluss der Flussrate auf den Partikeldurchmesser zu charakterisieren, wurden weitere Experimente mit der 120 µm Düse durchgeführt. Basierend auf dem Betriebskennfeld (Abb. 4.5b) wurde zunächst die Flussrate zwischen 2,0 mL/min und 3,0 mL/min variiert. Die Frequenz wurde konstant auf 1700 Hz festgelegt, um Mikropartikel ausschließlich im Betriebskennfeld zu generieren. Die Spannung der Elektrode wurde abhängig vom Volumenstrom zwischen 600 V und 2500 V gewählt und die Fallhöhe der Mikropartikel entsprechend angepasst. Zur Bestimmung des durchschnittlichen Partikeldurchmessers wurden mindestens 700 Stichproben mittels Bildverarbeitung ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.9a gezeigt. Bei einem Volumenstrom von 2,0 mL/min wurden Mikropartikel mit einem Durchmesser von 260 µm hergestellt, bei einer Flussrate von 3,0 mL/min betrug die Größe der Mikropartikel bereits 305 µm. Bei konstanter Frequenz hat demnach die Steigerung der Flussrate eine Zunahme der Partikelgröße zur Folge.

Analog zum vorangegangenen Experiment wurde der Einfluss der Frequenz auf die Partikelgröße untersucht. Dazu wurden Mikropartikel mit einem konstanten Volumenstrom von 2,0 mL/min zwischen 900 Hz und 2000 Hz, ergo im Betriebskennfeld, produziert und vermessen. Die Elektrodenspannung wurde jeweilig angepasst. Die Ergebnisse in Abbildung 4.9b zeigen einen deutlichen Einfluss der Vibrationsfrequenz auf den Durchmesser der Mikropartikel. Bei der niedrigsten Frequenz mit 900 Hz wurden Partikel mit einer mittleren Größe von 325 µm hergestellt, bei der höchsten Frequenz von 2000 Hz wurde der Durchmesser hingegen mit 245 µm bestimmt. Folglich verringert sich der Partikeldurchmesser, wenn die Vibrationsfrequenz erhöht wird.

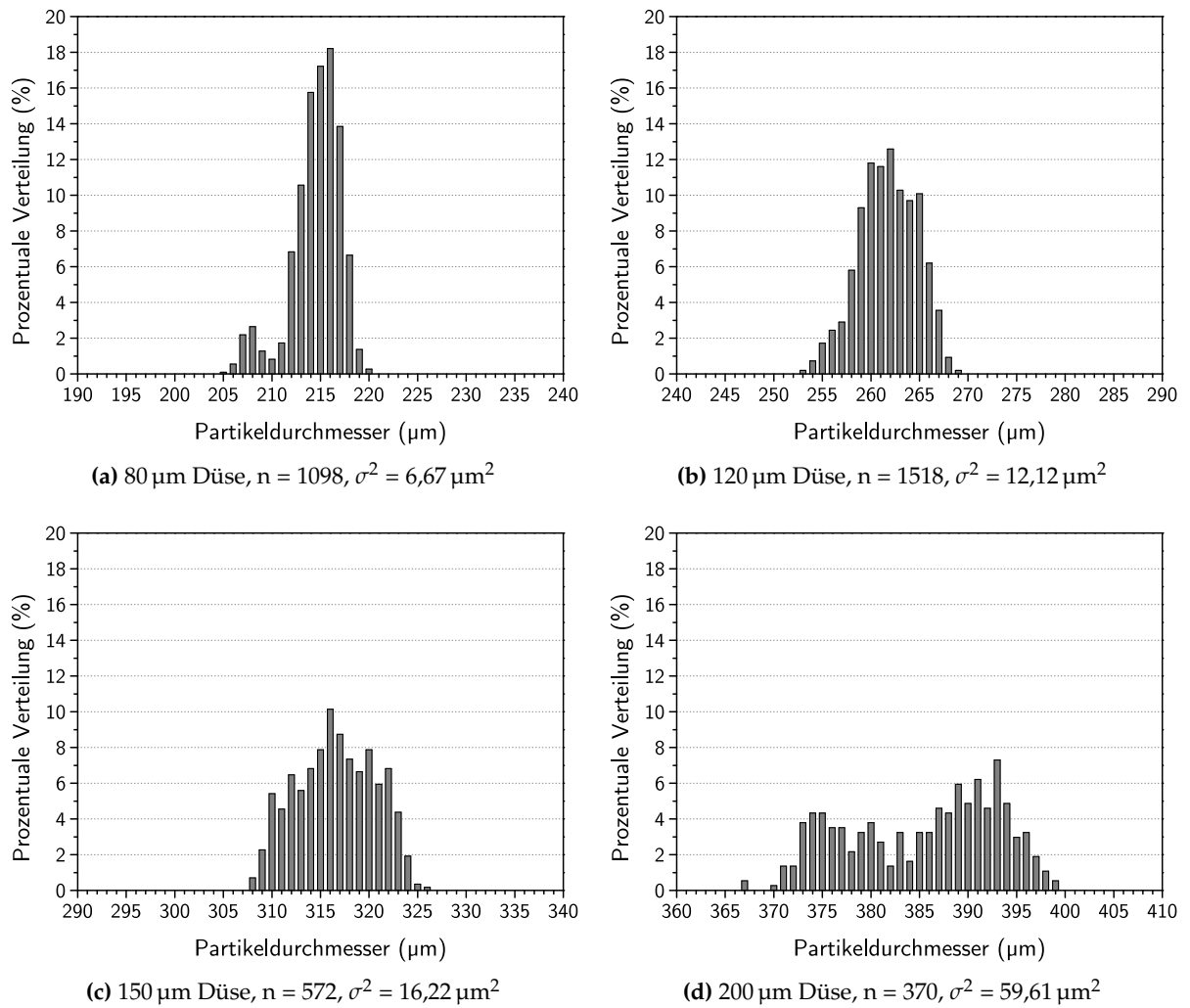


Abbildung 4.8 Größenverteilungen der Mikropartikel für die Düsendesigns 80 µm, 120 µm, 150 µm und 200 µm bei 1500 Hz.

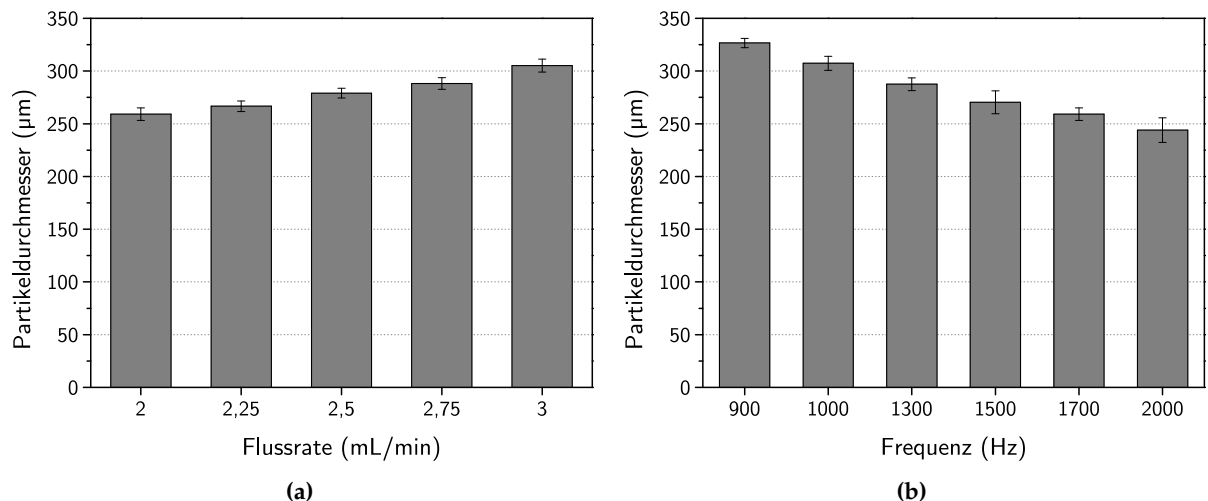


Abbildung 4.9 (a) Einfluss des Volumenstroms auf den Partikeldurchmesser. Parameter: 120 µm Düse, $f = 1700 \text{ Hz}$, Stichprobenanzahl $n > 700$, $SD < 2,30 \%$. (b) Einfluss der Vibrationsfrequenz auf den Partikeldurchmesser. Parameter: 120 µm Düse, $\dot{V} = 2,0 \text{ mL/min}$, Stichprobenanzahl $n > 700$, $SD < 4,78 \%$.

Die Änderung der Flussrate bzw. der Frequenz hat keinen signifikanten Einfluss auf die Varianz der Mikropartikel. Werden Mikropartikel innerhalb der Betriebskennfelder produziert, kann stets eine Standardabweichung (SD) unter 5 % erzielt werden. Die Standardabweichung erhöht sich jedoch, wenn Partikel außerhalb des Betriebskennfeldes generiert werden.

4.1.4 Herstellung und Charakterisierung von Core-Shell-Mikrokapseln

Wie bereits in Abschnitt 4.1.1 erläutert wurde, können mittels Encapsulator B-395 Pro auch Core-Shell-Mikrokapseln hergestellt werden. Der charakteristische Aufbau von Mikrokapseln wird durch das konzentrische Düsensystem, bei dem zwei Düsen ineinanderlaufen, erzielt. Im optimalen Fall werden mononukleidische Mikrokapseln, d. h. Kapseln mit einem Kern, generiert. Je nach Verfahren und Wahl der Parameter und Polymerlösungen können jedoch auch di- oder multinukleidische Mikrokapseln erzeugt werden.

Um die Funktionsweise und die Variationsmöglichkeiten aufzuzeigen, wurde Sonnenblumenöl zusammen mit einer Na-Alginatlösung verkapselt. Aufgrund der Hydrophobizität des Öls lassen sich Mikrokapseln erzeugen, bei denen sich der Core deutlich von dem Shell abhebt. Zur Herstellung der Core-Shell-Mikrokapseln wurde ein konzentrisches Düsensystem mit einer 200 μm Shell-Düse, sowie eine 120 μm Düse für die Core-Lösung gewählt. Die Vibrationsfrequenz von 600 Hz und ein Druck von 477 mbar zur Förderung der Shell-Lösung wurden konstant gehalten, während der Volumenstrom der Core-Lösung variiert wurde. Die Spannung der Elektrode wurde entsprechend angepasst und lag zwischen 1100 V und 2500 V.

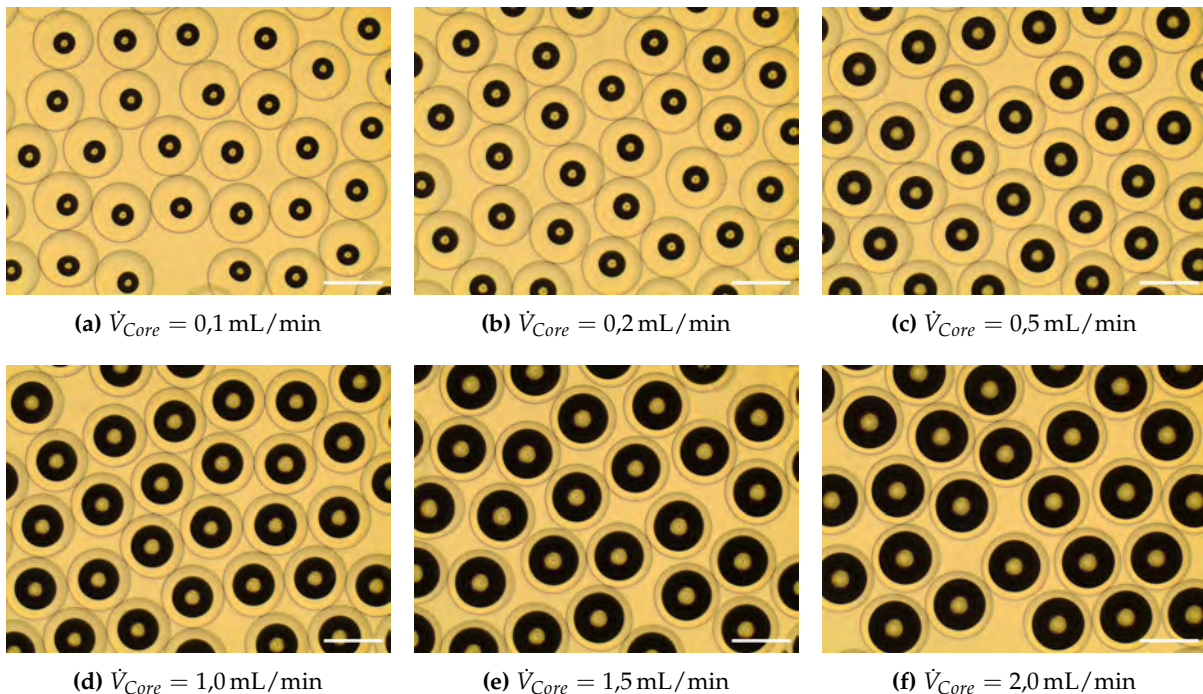


Abbildung 4.10 Alginat-Öl-Mikrokapseln produziert mit unterschiedlichen Core-Flussraten. Bei den hellen Kreisen innerhalb der Cores handelt es sich um Reflexionen des Öls. Parameter: 120/200 μm Düsen, $f = 600 \text{ Hz}$, $p = 477 \text{ mbar}$, 500 μm .

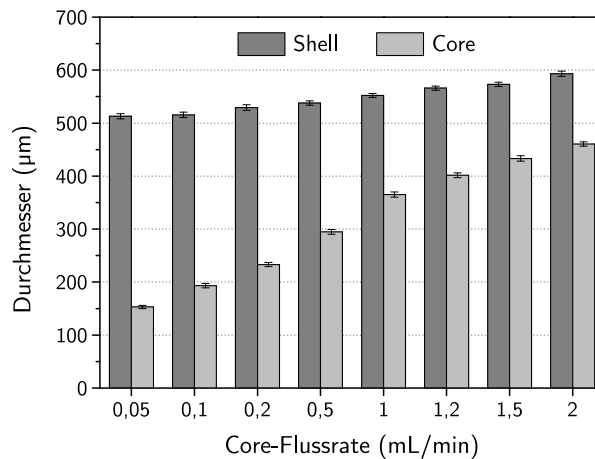


Abbildung 4.11 Einfluss der Core-Flussrate auf den Shell- und Core-Durchmesser bei Alginat-Öl-Mikrokapseln bei konstanter Frequenz und konstantem Druck. Für alle Messungen wurde eine Standardabweichung $< 2,1\%$ ermittelt.

Bei allen Flussraten konnten mononukleidische Core-Shell-Mikrokapseln produziert werden, die in Abbildung 4.10 für verschiedene Core-Flussraten gezeigt sind. Die Mikroskopbilder wurden ebenfalls mittels Bildverarbeitung ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.11 dargestellt. Dabei ist ein deutlicher Anstieg der Coregröße bei steigender Core-Flussrate zu beobachten. Der Core-Durchmesser lag bei einer Flussrate von $0,05\text{ mL/min}$ bei $153\text{ }\mu\text{m}$, wobei der Volumenstrom bis auf $2,0\text{ mL/min}$ erhöht werden konnte. Bei der maximal erreichten Flussrate wurde ein Core-Durchmesser von über $460\text{ }\mu\text{m}$ ermittelt. Ebenso stieg der gesamte Partikeldurchmesser von $515\text{ }\mu\text{m}$ auf fast $600\text{ }\mu\text{m}$ in Folge der steigenden Core-Flussrate an. Für alle Messungen wurde eine prozentuale Standardabweichung $< 2,1\%$ ermittelt.

Es konnte gezeigt werden, dass sich mit einer hydrophoben Lösung und einer Na-Alginatlösung uniforme sowie mononukleidische Core-Shell-Mikrokapseln erzeugen lassen. Durch die Erhöhung bzw. Verringerung der Core-Flussrate kann der Durchmesser des Cores variiert werden. Außerdem kann der Shell-Durchmesser durch Druckveränderung auf die gewünschten Bedingungen angepasst werden. Im Vergleich zu den Mikropartikeln in Abschnitt 4.1.3, bei denen zur Herstellung Frequenzen $> 800\text{ Hz}$ erforderlich waren, müssen für Mikrokapseln niedrigere Frequenzen zwischen 400 Hz und 800 Hz gewählt werden.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Herstellung von Core-Shell-Mikrokapseln ebenfalls mit zwei hydrophilen Lösungen möglich ist. Um identische Fließeigenschaften und somit ein einheitliches Abtropfverhalten zu gewährleisten, wurde eine $1,5\%$ Na-Alginatlösung als Core- und Shell-Lösung verwendet. Die Core-Lösung wurde allerdings mit Farbpigmenten versetzt. Dies ermöglichte einen deutlich sichtbaren Kontrast zwischen Shell- und Core-Bereich und simulierte zusätzlich die Verkapselung von Zellen in Mikropartikel.

Wie bereits bei den Alginat-Öl-Mikrokapseln konnten auch bei diesem Experiment mononukleidische Mikrokapseln erzeugt werden. In Abbildung 4.12 sind die mikroskopische Aufnahmen bei verschiedenen Volumenströmen dargestellt. Die Bilder zeigen, dass uniforme Partikel generiert wurden, die Cores der Mikrokapseln jedoch keine optimale Exzentrizität (Rundheit),

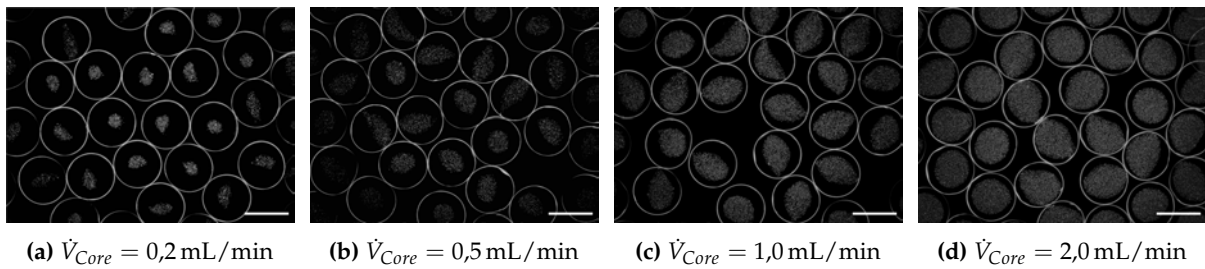


Abbildung 4.12 Alginat-Alginat-Mikrokapseln produziert mit unterschiedlichen Core-Flussraten. Für einen besseren Kontrast wurden der Core-Lösung Farbpigmente zugesetzt. Parameter: 150/200 μm Düsen, $f = 400 \text{ Hz}$, $p = 440 \text{ mbar}$, Messbalken: 500 μm .

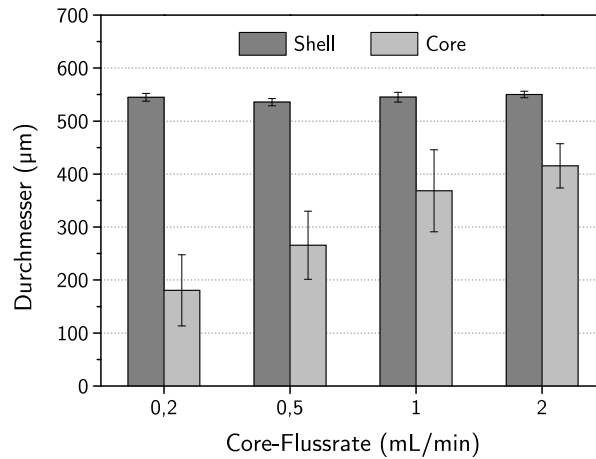


Abbildung 4.13 Einfluss der Core-Flussrate auf den Shell- und Core-Durchmesser bei Alginat-Alginat-Mikrokapseln bei konstanter Frequenz und konstantem Druck. Für alle Messungen wurde eine Standardabweichung $< 2,5\%$ (Shell) und $< 37\%$ (Core) ermittelt.

sondern teilweise eine längliche Form aufweisen. Dies könnte auf eine Vermischung der Shell- und Core-Lösung bei der Produktion bzw. beim Eintauchen in das Härtingsbad, oder auf ein ungleichmäßiges Abtropfverhalten am Düsenausgang hinweisen. Aufgrund der zum Teil unklaren Abgrenzungen von Shell und Core konnte lediglich der Partikeldurchmesser mittels Bildverarbeitung ausgewertet werden. Die Core-Durchmesser wurden manuell am Mikroskop einer Mehrfachbestimmung unterzogen.

Die Ergebnisse der Durchmesser in Abbildung 4.13 zeigen auch bei diesem Experiment, dass der Core-Durchmesser steigt, wenn die Core-Flussrate erhöht wird. Bei einer Flussrate von 0,2 mL/min wies der Core einen mittleren Durchmesser von 180 μm auf, der bis auf 415 μm bei einem Volumenstrom von 2,0 mL/min erhöht werden konnte. Der Partikeldurchmesser stieg minimal um insgesamt 5 μm von 545 μm auf 550 μm an. Die prozentuale Standardabweichung der Partikeldurchmesser lag, wie bei den bisher untersuchten Mikrokapseln unter 2,5%, wobei die Cores eine deutlich höhere Standardabweichung aufwiesen. Deren maximale Standardabweichung lag bei rund 37% (0,2 mL/min).

Es wurde gezeigt, dass sich mit dem konzentrischen Düsensystem auch hydrophile Lösungen in Ca-Alginat-Mikropartikel verkapseln lassen, wenngleich die Exzentrizität der Corebereiche

im Vergleich zu den Alginat-Öl-Mikrokapseln deutlich geringer ist. Dies lässt sich durch den hydrophilen Charakter der verwendeten Lösungen und die Vermischung an den Grenzschichten erklären.

Abschließend lassen sich anhand der durchgeführten Experimente einige Aussagen über die Prozessparameter und ihren Einfluss auf die Partikelgröße und Produktivität zusammenfassen. Die Zusammenhänge sind in Abbildung 4.14 grafisch veranschaulicht.

- Je größer der Düsendurchmesser, desto größer sind die Mikropartikel. Der Partikeldurchmesser weist etwa den doppelten Düsendurchmesser auf.
- Je höher der Volumenstrom, desto größer sind die Mikropartikel.
- Je höher die Vibrationsfrequenz, desto kleiner sind die Mikropartikel.
- Je größer die Mikropartikel, desto höher muss die elektrische Spannung sein, um die Partikel zu verteilen.
- Je höher die Viskosität, desto größer muss die Düsendgröße, der Volumenstrom sowie die Spannung sein, desto niedriger die Vibrationsfrequenz.
- Je höher die Viskosität, desto höher muss die Amplitude (Intensität) gewählt werden.

Parameter	Düsengröße	Vibrationsfrequenz	Flussrate	Elektrische Spannung	Viskosität
Ergebnis	⌞	⌞	⌞	⌞	⌞
Partikelgröße	↑	↓	↑	↑	↑
Produktivität	↑	↑	↑	—	—
Viskosität ⌞	↑	↓	↑	↑	

Abbildung 4.14 Übersicht über die Prozessparameter und ihren Einfluss auf die Partikelgröße und Produktivität, sowie die Anpassung der Prozessparameter bei Verwendung von höher viskosen Flüssigkeiten. Die Pfeile geben die Richtung und die Pfeilgröße die Einflussstärke auf die Partikelproduktion an [80].

4.2 Rheologische Charakterisierung von Hydrogelen

Die Viskosität von flüssigen Hydrogelen, wie zum Beispiel einer Na-Alginatlösung, hat einen großen Einfluss auf die Verarbeitung mittels Encapsulator. In Tabelle 4.2 wurde gezeigt, dass abhängig von dem Düsendurchmesser nur bestimmte Konzentrationsbereiche einer Na-Alginatlösung zur Herstellung monodisperser Mikropartikeln verwendet werden können. Die Vibrationsfrequenz, die Flussrate und die elektrische Spannung müssen abhängig von der

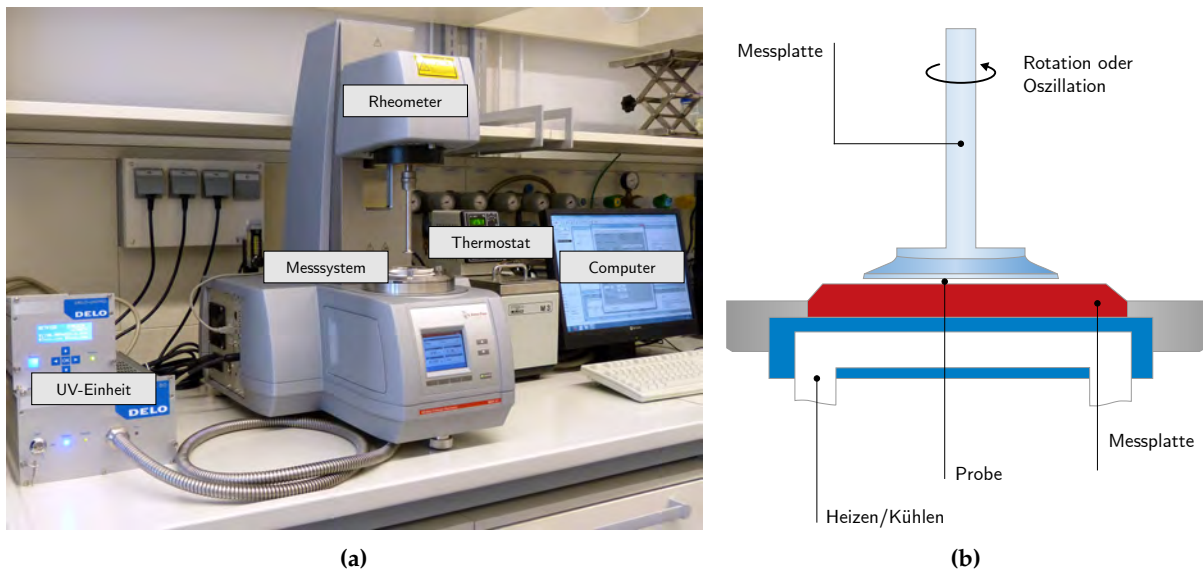


Abbildung 4.15 (a) Frontansicht des Rheometers MCR 302 und Module zur Untersuchung von photosensitiven und thermoresponsiven Hydrogelen: Die Probe kann über ein Peltier-Element temperiert oder eine UV-Einheit mit UV-Licht bestrahlt werden. (b) Schematische Darstellung des Platte-Platte-Messsystems: Die Probe wird zwischen den beiden Messplatten platziert und Rotations- bzw. Oszillationsbewegungen ausgesetzt [81].

Viskosität entsprechend angepasst werden (Abb. 4.14). Daher ist es von Bedeutung auch die Viskositätsfunktionen der Na-Alginatlösungen zu kennen. Für die Kultivierung von Zellen in soliden 3D Hydrogelsystemen ist es außerdem erforderlich, weitere mechanische Eigenschaften wie beispielsweise die Festigkeit und Viskoelastizität zu analysieren. Sie stellen wichtige Faktoren für die Zelladhäsion sowie für das Wachstum der Zellen dar und können mittels Rheometer bestimmt werden.

Im ersten Abschnitt wird zunächst das Rheometer sowie die verwendeten Spezialmodule vorgestellt. Anschließend werden die Viskositätsfunktionen unterschiedlicher Na-Alginatlösungen dargestellt. Auch die Viskositätsfunktionen der Fibrinogen-basierten Hydrogele werden gezeigt, deren mechanischen Eigenschaften ab dem dritten Abschnitt näher charakterisiert werden. Hier wird vor allem der Einfluss des UV-Lichts sowie der Temperatur auf das photosensitive PF-Hydrogel bzw. das thermoresponsive FF-Hydrogel gezeigt.

4.2.1 Messprinzip und Funktionsweise des Rheometer

Die Hydrogele wurden mit einem Oszillations- und Rotationsrheometer MCR 302 (Anton Paar GmbH) analysiert. Rheometer sind sehr robust, sensitiv und erlauben es Viskositätsfunktionen von viskosen Flüssigkeiten zu bestimmen. Darüber hinaus ist es möglich Vernetzungsprozesse, wie zum Beispiel eine Polymerisation aufzunehmen, so dass die Festigkeit von Hydrogelen bestimmt werden kann. Das für die Charakterisierung verwendete Rheometer ist mit einem Peltier-Element, einem UV-Aushärtungssystem und einer modularen Platte-Platte-Geometrie ausgestattet. Die wichtigsten Komponenten des Rheometers sind in Abbildung 4.15 dargestellt.

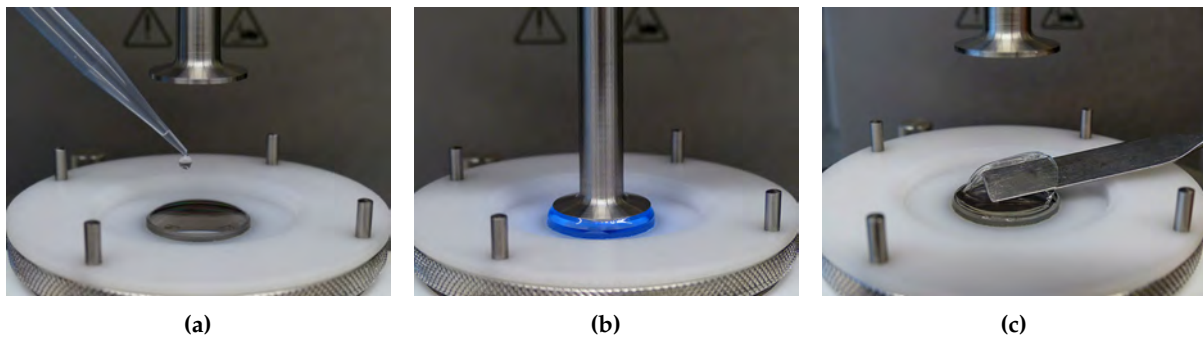


Abbildung 4.16 Schritte der rheologischen Messung eines photosensitiven Hydrogels: (a) flüssiges Hydrogel, (b) Polymerisation des Hydrogels durch UV-Licht und (c) festes Hydrogel.

Das Peltier-Element (P-PTD 200) erlaubt eine homogene Temperaturverteilung in der gesamten Probe und ermöglicht die Untersuchung eines Hydrogels bei einer konstanten Temperatur, einem Gradienten oder einem Temperaturzyklus. Das System ist für die Analyse von Hydrogelen, die über eine Temperaturänderung oder enzymatisch vernetzt werden, geeignet und kann zur Bestimmung von Viskositätsfunktionen verwendet werden.

Hydrogele, die über eine Photopolymerisationsreaktion ausgehärtet werden, erfordern hingegen ein Messsystem mit einer UV-Lampe. Die Messplatte der UV-Einheit (P-PTD 200/GL) besteht aus einer Quarzglasplatte, und ermöglicht eine homogene UV-Aushärtung einer Probe. Als UV-Lichtquelle dient eine Delolux 80 LED-Lampe mit einer Wellenlänge von 365 nm (Delo GmbH). Außerdem verfügt das UV-System über eine ringförmig angeordnete Peltier-Temperierung.

Vernetzungsreaktionen, die durch Temperaturänderung oder UV-Licht initiiert werden, ermöglichen es die Materialveränderung vom flüssigen bis zum vollständig ausgehärteten Hydrogel mittels Rheometer zu analysieren. Die Schritte einer rheologischen Messung sind in Abbildung 4.16 beispielhaft für ein photosensitives Hydrogel dargestellt. Zur Analyse wird das flüssige Hydrogel zwischen zwei parallel angeordneten Platten platziert und durch UV-Licht bzw. durch Temperaturänderung vernetzt. Rotations- bzw. Oszillationsbewegungen erzeugen eine Scherströmung in der Probe, die gemessen wird. Der gemessene Speichermodul (G') und der Verlustmodul (G'') geben Einblicke in die Hydrogelstruktur und zeigen die Festigkeit einer Probe. Der Speichermodul ist ein Maß für die während des Scherprozesses im Probenmaterial gespeicherte Deformationsenergie. Die Energie steht nach der Entlastung vollständig zur Verfügung und wirkt als Triebfeder der Rückdeformation, die die vorhergehende Deformation teilweise oder vollkommen ausgleicht. Der Speichermodul repräsentiert das elastische Verhalten (Festigkeit) der Messprobe. Der Verlustmodul ist hingegen ein Maß für die während des Scherprozesses im Probenmaterial verbrauchte und danach für die Messprobe verlorene Deformationsenergie. Diese Energie wird aufgebraucht und/oder an die Umgebung abgegeben, zum Beispiel wenn die Messprobe vollständig fließt (viskoser Anteil) [82].

Alle Proben wurden in einem 1,2 mm breiten Messspalt aufgegeben und bei einem Plattenabstand von 1 mm untersucht. Das Probenvolumen betrug abhängig von dem Durchmesser

der Messgeometrie 400 μL (\varnothing 20 mm) bzw. 1,8 mL (\varnothing 40 mm) für die Bestimmung der Viskositätsfunktionen. Zur Untersuchung der Viskositäten wurden die Proben Rotationsbewegungen ausgesetzt, während Oszillationsbewegungen zur Aufnahme der Speicher- bzw. Verlustmodule dienten. Dazu wurden alle Messungen, sofern nicht anders angegeben, mit 2 % Deformation und einer Frequenz von 1 Hz bei 20 °C durchgeführt. Die Spezifikationen der einzelnen Module des Rheometers sind in Tabelle B.1 zusammengefasst.

4.2.2 Viskositätsfunktionen von Na-Alginatlösungen

Na-Alginat können mit unterschiedlichen Viskositätsangaben und in verschiedenen Reinheitsstufen von Herstellern bezogen werden. Es galt daher ein geeignetes Na-Alginat zu finden, das sich zur Herstellung von Mikropartikeln mittels Encapsulator eignet und dessen mögliche Viskositätsbereiche zu bestimmen. Insgesamt wurden vier verschiedene Na-Alginat (A2111, A2158, 71238, A2033) untersucht, die alle von Sigma-Aldrich Chemie GmbH vertrieben werden.

Für die Viskositätsbestimmungen wurden aus allen Na-Alginaten 1,5 % (w/v) Lösungen hergestellt und rheologisch untersucht. In Abbildung 4.17a sind die Viskositätsfunktionen, die mit einer logarithmischen Steigerung der Scherrate von 1 s^{-1} bis 1000 s^{-1} analysiert wurden, dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass alle Na-Alginatlösungen unterschiedliche Viskositäten und ein scherverdünnendes Verhalten aufweisen. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, beziehen sich alle im Folgenden genannten Viskositätsangaben auf eine Scherrate von 1 s^{-1} . Die Produkte A2111 und A2158 weisen mit 15,3 mPa·s bzw. 67,3 mPa·s niedrige Viskositäten auf, während die Na-Alginatlösung des Produkts A2033 mit 1080 mPa·s die höchste Viskosität aufweist. Die Na-Alginatlösung, die aus dem Produkt 71238 hergestellt wurde, weist eine mittlere Viskosität von 453 mPa·s auf.

Bei der Verarbeitung der Na-Alginatlösungen mittels Encapsulator (120 μm Düse) zeigte sich, dass monodisperse Mikropartikel lediglich mit Lösungen aus den Produkten A2158 und 71238 hergestellt werden können. Mit der Na-Alginatlösung aus Produkt A2111 konnte aufgrund der geringen Viskosität kein laminarer Flüssigkeitsstrahl erzeugt werden, während die Lösung aus Produkt A2033 aufgrund der hohen Viskosität nicht mit der Spritzenpumpe gefördert werden konnte. Auch durch Variation der Na-Alginatkonzentration (A2111, A2033) konnten keine monodispersen Mikropartikel generiert werden. Da das Produkt A2158 seit Mitte des Jahres 2012 nicht mehr vertrieben wird, wurde für die Charakterisierung des Encapsulators (Abschnitt 4.1) das Produkt 71238 verwendet, das im Folgenden rheologisch näher charakterisiert wird.

Anhand der Abbildung 4.14 wurde erläutert, dass die Na-Alginatkonzentration an den Düsendurchmesser angepasst werden muss und die Konzentration einen entscheidenden Einfluss auf die Viskosität hat. Um den Einfluss der Konzentrationen auf die Viskosität zu zeigen, wurden Viskositätsfunktionen mit unterschiedlichen Na-Alginatkonzentrationen (71238) aufgenommen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.17b dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Viskosität mit

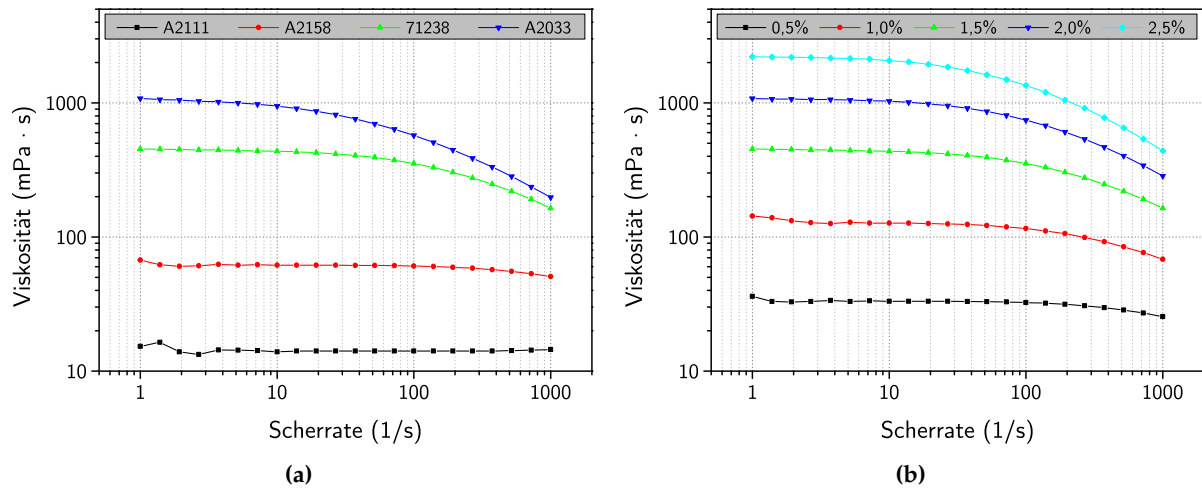


Abbildung 4.17 (a) Viskositätsfunktionen von 1,5% Na-Alginatlösungen aus verschiedenen Na-Alginaten. (b) Viskositätsfunktionen von Na-Alginatlösungen (71238) unterschiedlicher Konzentration.

der Konzentration exponentiell steigt. Eine 0,5% Lösung hat eine Viskosität von 36,1 mPa·s, während die Viskosität einer 2,5% Lösung mit 2210 mPa·s bestimmt wurde. Eine 1,5% Lösung, die für die Verkapselung von Zellen verwendet wurde, weist eine Viskosität von 453 mPa·s auf. In Tabelle 4.2 wurde gezeigt, dass sich für die Herstellung von Mikropartikeln mit einem Düsendurchmesser von 120 μm bis 200 μm Na-Alginatlösungen zwischen 1,0% und 1,6% eignen. Dies entspricht Na-Alginatlösungen mit Viskositäten zwischen 140 mPa·s bis 550 mPa·s, die für die Partikelproduktion mittels Encapsulator verwendet werden können. Je höher die Konzentration der Na-Alginatlösung ist, umso höher ist ihre Viskosität, desto größer muss der Düsendurchmesser bzw. höher die Flussrate zur Herstellung von Mikropartikeln gewählt werden.

Für die Kultivierung von Zellen in Ca-Alginat-Mikropartikeln muss die Na-Alginatlösung steril vorliegen. Daher wurde der Einfluss des Autoklavierprozesses bzw. der Sterilfiltration auf die Viskosität einer Na-Alginatlösung untersucht. Dazu wurde eine unsterile 1,5% Na-Alginatlösung (71238) für 20 min bei 121 $^{\circ}\text{C}$ und 2 bar autoklaviert bzw. 0,2 μm sterilfiltriert. Die Viskositätsfunktionen der unterschiedlich behandelten Na-Alginatlösungen sind in Abbildung 4.18a dargestellt. Es ist zu sehen, dass die unsterile und die sterilfiltrierte Na-Alginatlösung nahezu exakte Viskositäten bei gleicher Scherrate aufweisen. Die Viskosität bei 1 s^{-1} beträgt 453 mPa·s für die unsterile und 443 mPa·s für die sterilfiltrierte Lösung. Die autoklavierte Na-Alginatlösung weist mit 38,2 mPa·s eine deutlich niedrigere Viskosität auf. Dies ist auf die Hydrolyse der Alginatpolymere während des Autoklaviervorgangs zurückzuführen [83, 84]. Die Sterilfiltration ist daher eine geeignete Methode eine Na-Alginatlösung zu sterilisieren, da die Viskosität der Lösung durch die Filtration nicht beeinflusst wird. Für die Verkapselung von Zellen in Ca-Alginat-Mikropartikel (Abschnitt 4.3) wurden daher ausschließlich sterilfiltrierte Na-Alginatlösungen verwendet. Des Weiteren können die Erkenntnisse und Parameter zur Herstellung von Mikropartikeln mittels Encapsulators, die in Abschnitt 4.1 mit unsterilen Na-Alginatlösungen gewonnen wurden, auf sterilfiltrierte Lösungen übertragen werden.

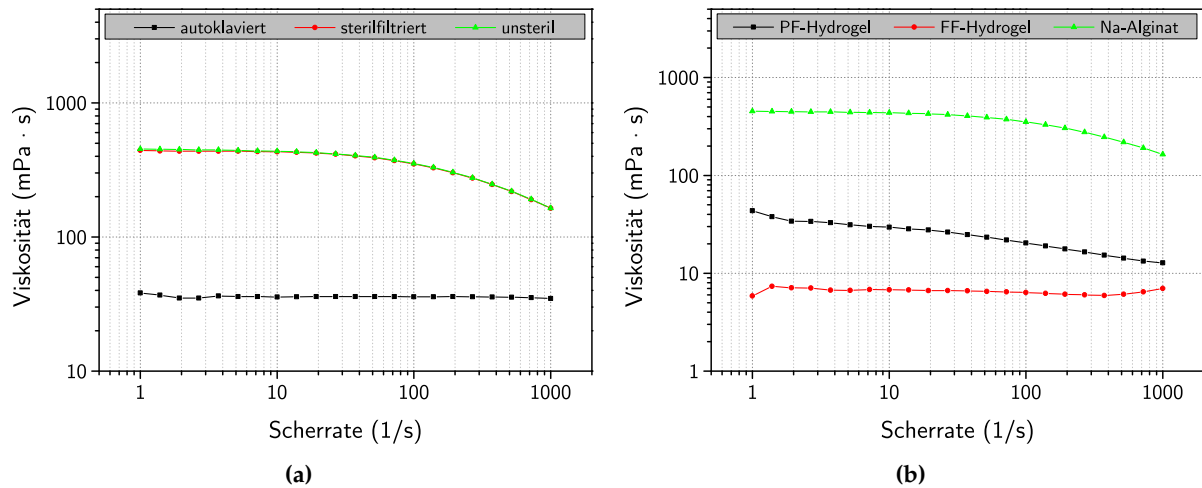


Abbildung 4.18 (a) Viskositätsfunktionen einer autoklavierten, 0,2 μm sterilfiltrierten und einer unsterilen 1,5 % Na-Alginatlösung (71238). (b) Viskositätsfunktionen der Fibrinogen-basierten Hydrogele sowie einer 1,5 % Na-Alginatlösung (71238).

Neben den gezeigten Viskositäten der Na-Alginatlösungen wurden auch Viskositätsfunktionen zweier flüssiger Fibrinogen-basierter Hydrogele aufgenommen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.18b dargestellt. Während das photosensitive PF-Hydrogel ein scherverdünnendes Verhalten aufweist (43,6 mPa·s), ist bei dem thermoresponsiven FF-Hydrogel ein idealviskoses Verhalten zu beobachten (5,9 mPa·s). Insgesamt weisen beide Fibrinogen-basierten Hydrogele deutlich geringere Viskositäten auf, als die Na-Alginatlösung (453 mPa·s). Da die Festigkeit der Fibrinogen-basierten Hydrogele maßgeblich durch die Bestrahlung mit UV-Licht bzw. durch Temperaturänderung beeinflusst wird, werden die Hydrogele im Folgenden dahingehend rheologisch charakterisiert.

4.2.3 Photosensitive Hydrogele

Photosensitive Hydrogele, wie das semisynthetische PF-Hydrogel, können durch die Bestrahlung mit UV-Licht polymerisiert werden. Dabei wird ein Photoinitiator durch UV-Licht aktiviert und Polymere über eine Polymerisationsreaktion kovalent gebunden (Abschnitt 3.2.2). Zur Ermittlung einflussnehmender Parameter wurden im Folgenden die Auswirkungen der Intensität des UV-Lichts, der Bestrahlungsdauer und der PEGDA-Konzentration auf die Hydrogelfestigkeit untersucht. Außerdem wurde untersucht, ob sich die Festigkeit der Hydrogele durch die Lagerung bei 4 °C über mehrere Monate ändert.

Einfluss der Intensität des UV-Lichts

Zunächst wurde der Einfluss der Intensität des UV-Lichts auf den Polymerisationsprozess untersucht. Dazu wurde der Verlauf der Polymerisation bei verschiedenen Intensitäten (5 %, 10 %, 15 % und 20 %) aufgenommen. Die Hydrogele wurden jeweils für 10 min mit UV-Licht

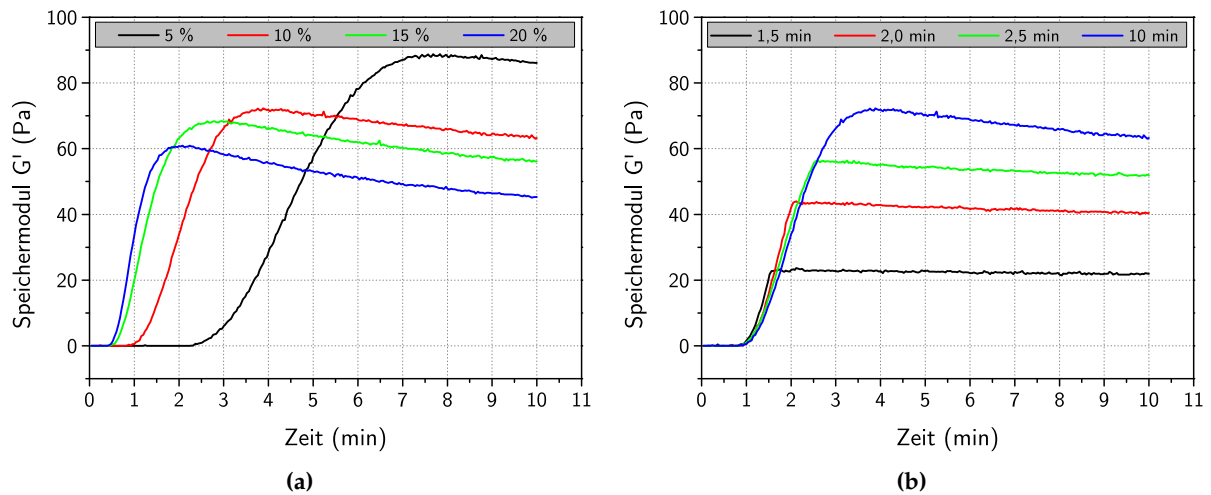


Abbildung 4.19 (a) Einfluss der Intensität des UV-Lichts auf die Polymerisation des PF-Hydrogels bei einer konstanten Belichtungsdauer von 10 min bei 2 % Deformation und 1 Hz. (b) Einfluss der UV-Bestrahlungsdauer auf die Polymerisation des PF-Hydrogels bei 2 % Deformation, 1 Hz und einer Intensität des UV-Lichts von 10 %.

bestrahlt und die Änderung des Speichermoduls gemessen. Die UV-Intensität (mW/cm^2) in Abhängigkeit der Amplitude (%) ist in Abbildung B.4 gezeigt.

Die in Abbildung 4.19a dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine höhere Intensität des UV-Lichts zu einem früheren Beginn der Polymerisationsreaktion führt und die Reaktion mit höherer Geschwindigkeit abläuft. Allerdings werden die Hydrogele mit steigender Intensität des UV-Lichts weniger fest. Der Speichermodul nimmt, nachdem ein maximaler Wert erreicht wurde, ab. Dies deutet darauf hin, dass die lange Bestrahlungsdauer mit UV-Licht eine schädigende Wirkung auf das Fibrinogen bzw. auf die Polymerketten des Hydrogels hat. Ein hoher Energieeintrag bewirkt Bindungsbrüche der Polymerketten, wodurch sich die Festigkeit des Hydrogels verringert. Dies bedeutet, dass festere Hydrogele durch Bestrahlung mit einer niedrigeren Intensität erzeugt werden können. Eine lange Bestrahlungszeit sollte jedoch vermieden werden, um die Polymerstruktur nicht zu zerstören. Der Verlustmodul zeigt bei allen Untersuchungen des PF-Hydrogels Werte zwischen 0 und 2 Pa und erreichte somit geringere Werte als der Speichermodul. Da der Speichermodul überwiegt, kann das Hydrogel als festkörperartiges Hydrogel bezeichnet werden, das kaum viskose Eigenschaften aufweist.

Einfluss der UV-Bestrahlungsdauer

Neben der Intensität ist auch die Dauer der Bestrahlung mit UV-Licht ein wichtiger Parameter. Daher wurde der Einfluss der Bestrahlungsdauer auf das PF-Hydrogel untersucht. Das Hydrogel wurde bei konstanter Intensität des UV-Lichts (10 %) einer Bestrahlungsdauer von 1,5 min, 2 min, 2,5 min und 10 min ausgesetzt und der Speichermodul über einen Zeitraum von 10 min aufgezeichnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.19b dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass mit längerer Bestrahlungsdauer die Festigkeit der Hydrogele zunimmt. Für die vollständige Polymerisation des Hydrogels war eine Bestrahlungszeit von

rund 4 min notwendig, wobei ein maximaler Speichermodul von 72 Pa erreicht wurde. Wurde das Hydrogel weniger als 4 min mit UV-Licht bestrahlt, stagnierte der Speichermodul auf einem konstanten Wert. Dabei wurden je nach Bestrahlungszeit unterschiedliche maximale Speichermodule erreicht. Dies bedeutet, dass eine kurze Initiierung mit UV-Licht nicht ausreicht, um das Hydrogel vollständig zu polymerisieren, sondern die Polymerisationsreaktion nur so lange abläuft, wie das Hydrogel mit UV-Licht bestrahlt wird. Außerdem ist anhand der Abbildung 4.19b zu sehen, dass sich der Speichermodul bei einer UV-Bestrahlungsdauer von 1,5 min bis 2,5 min nach der UV-Bestrahlung nur geringfügig ändert. Dies unterstützt die zuvor getroffene Aussage, dass das UV-Licht nicht nur kovalente Bindungen generiert, sondern bei zu langer Bestrahlungszeit auch Bindungen zwischen den Polymerketten bricht.

Einfluss der PEGDA-Konzentration

Die Zusammensetzung der Hydrogele kann durch die Zugabe von einem zusätzlichen Quervernetzer PEGDA variiert und somit die Festigkeit der Hydrogele beeinflusst werden (Abschnitt 3.2.2). Um den Einfluss von PEGDA auf das Hydrogel zu untersuchen, wurde PF-Hydrogel mit 0 %, 1 % und 2 % PEGDA hergestellt und für 2 min bzw. 10 min mit UV-Licht einer Intensität von 10 % bestrahlt. Der Polymerisationsprozess wurde anhand der Speichermodule aufgezeichnet und in Abbildung 4.20 dargestellt.

Nach einer Bestrahlungszeit von 2 min (Abb. 4.20a) weist das Hydrogel mit 0 % PEGDA ein Speichermodul von 60 Pa auf, während bei dem Hydrogel mit 2 % PEGDA lediglich ein Speichermodul von 4 Pa zu beobachten ist. Dies entspricht nicht dem erwarteten Verhalten, da eine höhere PEGDA-Konzentration zu festeren Hydrogelen führen müsste. Die entgegengesetzte Beobachtung ist auf den unterschiedlichen Beginn der Polymerisationsreaktion zurückzuführen. Wird auf die Zugabe von PEGDA verzichtet, beginnt die Quervernetzung deutlich früher, da Diacrylate aktiviert werden, die an Fibrinogenfragmente konjugiert sind. Liegt hingegen eine hohe Konzentration an PEGDA vor, werden zu Beginn vor allem PEGDA-Monomere aktiviert und untereinander kovalent gebunden. Dies führt zunächst nur zur Bildung von polymeren Ketten und nicht zwangsläufig zu Quervernetzungen. Die polymeren Ketten vernetzen sich erst untereinander, wenn sich die Konzentration an PEGDA-Monomeren verringert. Wird die Bestrahlungsdauer auf 10 min erhöht (Abb. 4.20b), ist das erwartete Verhalten zu erkennen. Während das Hydrogel ohne Zugabe von PEGDA ein Speichermodul von 130 Pa aufweist, ist bei dem Hydrogel mit 1 % PEGDA ein Wert von 942 Pa zu verzeichnen. Mit 2 % PEGDA steigt der Speichermodul sogar auf einen Wert von 2727 Pa an. Das Experiment zeigt, dass eine höhere PEGDA-Konzentration zu einer höheren Festigkeit des Hydrogels führt. Dabei muss allerdings die Bestrahlungsdauer berücksichtigt werden, da gezeigt wurde, dass sich mit höherer PEGDA-Konzentration die Quervernetzung verzögert.

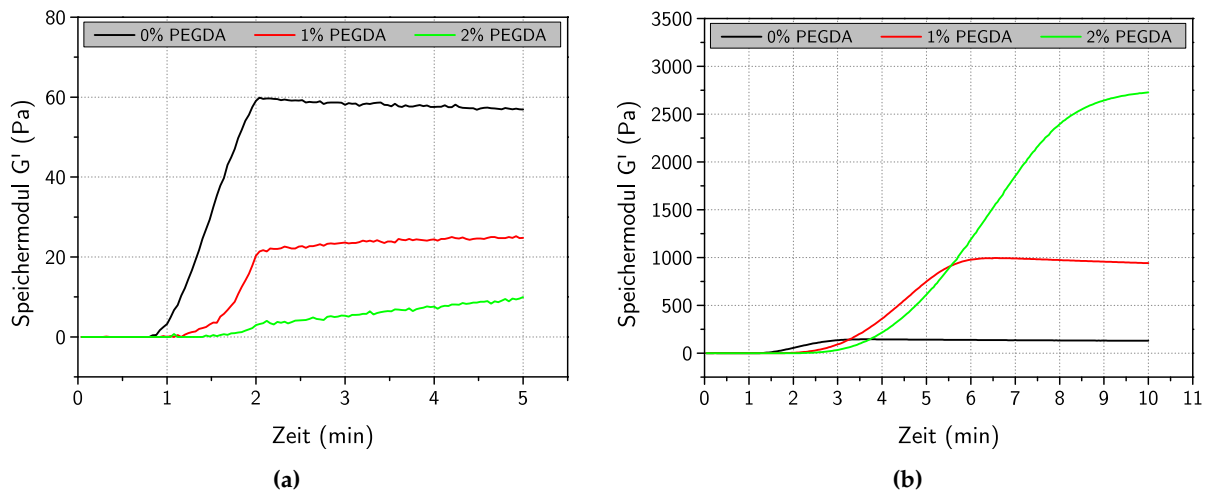


Abbildung 4.20 (a) Einfluss der PEGDA-Konzentration auf die Polymerisation des PF-Hydrogels bei einer konstanten Belichtungsdauer von 2 min bei 2 % Deformation, 1 Hz und einer Intensität des UV-Lichts von 10 %. (b) Einfluss der PEGDA-Konzentration auf die Polymerisation des PF-Hydrogels bei einer konstanten Belichtungsdauer von 10 min bei 2 % Deformation, 1 Hz und einer Intensität des UV-Lichts von 10 %.

Einfluss der Lagerung auf die Hydrogelfestigkeit

Zur Untersuchung der Lagerstabilität wurden zwei PF-Hydrogelchargen in regelmäßigen Abständen rheologisch vermessen. Dazu wurden die Hydrogele 10 min mit UV-Licht bestrahlt und die maximalen Werte des Speichermoduls aufgenommen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.21 zusammenfassend dargestellt. Da die Polymer-Protein-Bindungen durch Einfrieren zerstört werden können, wurden die flüssigen Hydrogele bei 4 °C im Kühlschrank lichtgeschützt gelagert.

In Abbildung 4.21 ist zu erkennen, dass die Speichermodule der untersuchten Hydrogelchargen bereits an Tag 0 unterschiedliche Werte aufweisen. Der maximale Speichermodul der Charge vom 23.04.14 wurde mit 120 Pa bestimmt, während die Charge vom 13.07.14 einen Wert von 146 Pa aufweist. Dies zeigt, dass die Qualität aufgrund der chemischen Synthese nicht vollständig reproduzierbar ist. Innerhalb von 3 Monaten sinkt die Festigkeit beider Hydrogelchargen signifikant. Bei der Hydrogelcharge vom 23.04.14 sinkt der Wert des Speichermoduls von 120 Pa binnen 90 Tagen auf 38 Pa. Dies entspricht einem Verlust von fast 70 %. Um bei der Kultivierung von Zellen in soliden Hydrogelsystemen reproduzierbare und verlässliche Ergebnisse zu erhalten, muss die Änderung der Hydrogelfestigkeit durch die Lagerdauer berücksichtigt werden.

Die Hydrogele sollten daher nicht länger als 30 Tage verwendet werden. Alternativ kann durch die Zugabe von zusätzlichem Quervernetzer PEGDA der ursprüngliche Wert des Speichermoduls wieder hergestellt werden. Die benötigte PEGDA-Konzentration kann mittels rheologischer Messungen ermittelt werden. Allerdings können durch die Lagerung auch Fibrinogenfragmente geschädigt werden, so dass die Adhäsion der Zellen an die Polymermatrix beeinträchtigt oder nicht mehr möglich ist.

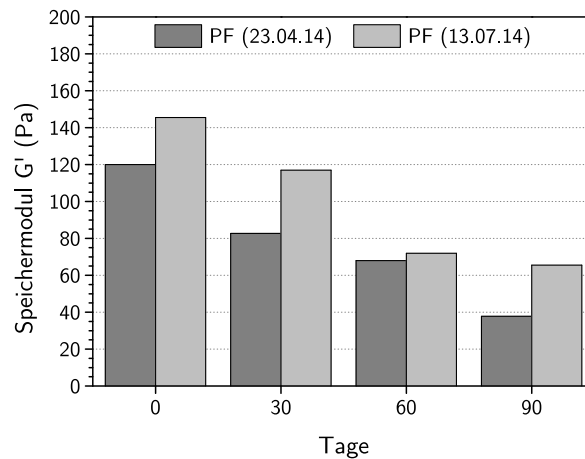


Abbildung 4.21 Einfluss der Lagerung zweier PF-Hydrogele unterschiedlicher Chargen über einen Zeitraum von 90 Tagen. Die Messungen wurden bei 2 % Deformation, 1 Hz, einer UV-Bestrahlungsdauer von 10 min und Intensität des UV-Lichts von 10 % durchgeführt.

4.2.4 Thermoresponsive Hydrogele

Thermoresponsive Hydrogele, wie das FF-Hydrogel, bestehen hauptsächlich aus dem Polymer Pluronic® F127 und können durch Temperaturänderung reversibel vernetzt werden. Dabei werden keine kovalenten Bindungen zwischen den Polymeren erzeugt (Abschnitt 3.2.2). Allerdings besteht analog zu den PF-Hydrogelen auch bei den FF-Hydrogelen die Möglichkeit einer irreversiblen Polymerisation mit UV-Licht. Im Folgenden wird der Einfluss von PEGDA auf das FF-Hydrogel sowie die thermoreversiblen Eigenschaften bei unterschiedlichen Anfangstemperaturen untersucht. Außerdem werden Kombinationen aus Temperatur/UV-Licht bzw. UV-Licht/Temperatur rheologisch analysiert und miteinander verglichen.

Vernetzung durch Temperaturänderung und der Einfluss von PEGDA

Analog zum PF-Hydrogel kann die Zusammensetzung des FF-Hydrogels durch die Zugabe von zusätzlichem Quervernetzer PEGDA variiert und somit die Festigkeit der Hydrogele beeinflusst werden. Zur Untersuchung des Einflusses von PEGDA wurde FF-Hydrogel mit 0 %, 1 % und 2 % PEGDA hergestellt und mit dem Peltier-Element des Rheometers vermessen. Nach 1 min Equilibrierung der Probe bei 15 °C wurde das Hydrogel mit einer Heizrate von 9 °C/min auf 37 °C erwärmt und die Temperatur für 5 min konstant gehalten. Um die reversiblen Eigenschaften des FF-Hydrogels zu untersuchen, wurde die Probe anschließend mit einer Kühlrate von 9 °C/min auf 15 °C abgekühlt. Der Verlauf der Speicher- und Verlustmodule der rheologischen Messungen sind in Abbildung 4.22 gezeigt.

In Abbildung 4.22a ist die thermoreversible Eigenschaft des FF-Hydrogel anhand des Speichermoduls zu erkennen. Das Hydrogel ist bei einer Temperatur von 15 °C zunächst flüssig (0 Pa). Durch die Temperaturänderung auf 37 °C verfestigt sich das Hydrogel abhängig von der

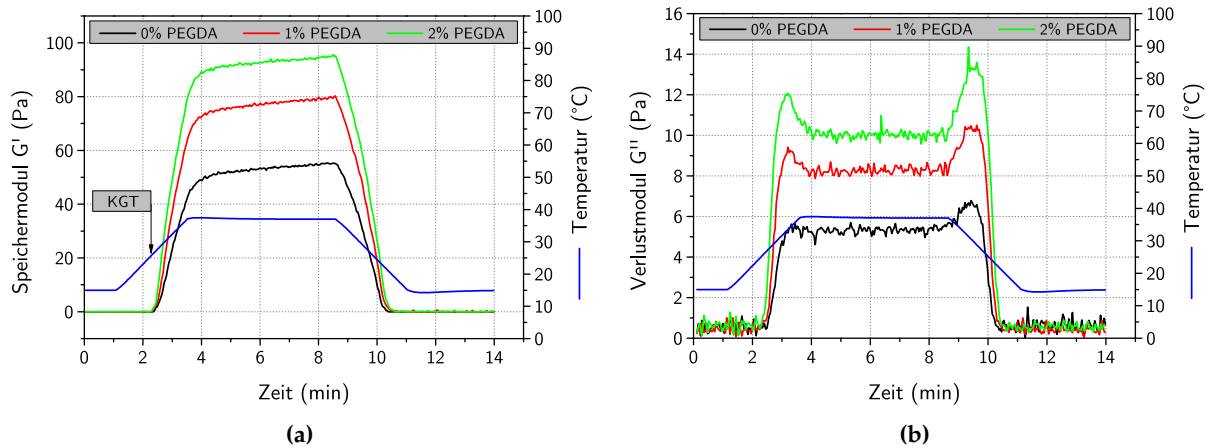


Abbildung 4.22 Einfluss der PEGDA-Konzentration auf die Polymerisation des FF-Hydrogels bei einem Temperaturshift von 15 $^{\circ}\text{C}$ \rightarrow 37 $^{\circ}\text{C}$ \rightarrow 15 $^{\circ}\text{C}$. (a) Speichermodul G' und (b) Verlustmodul G'' in Abhängigkeit der Zeit bei 2% Deformation und 1 Hz.

PEGDA-Konzentration (0%, 1% und 2%) auf 56 Pa, 80 Pa und 96 Pa. Ferner ist zu erkennen, dass die kritische Gelierungstemperatur (KGT) des FF-Hydrogels bei 25 $^{\circ}\text{C}$ liegt. Die KGT beschreibt die Temperatur, bei dem sich der Speichermodul erstmalig ändert. Nach Absenken der Temperatur auf 15 $^{\circ}\text{C}$ liegt das Hydrogel flüssig vor und weist ein Speichermodul von 0 Pa auf. Eine höhere PEGDA-Konzentration hat demnach eine höhere Festigkeit des Hydrogels zur Folge, obwohl keine Polymerisationsreaktion durch UV-Licht stattgefunden hat. Dies ist damit zu begründen, dass die Hydrogele abhängig von ihrer PEGDA-Konzentration einen höheren Anteil an Polymeren aufweisen, die sich ineinander verhaken können und somit ein festeres Hydrogel ausbilden können. Einen ähnlichen Verlauf zeigt der Verlustmodul, der in Abbildung 4.22b gezeigt ist. Insgesamt erreicht der Verlustmodul jedoch deutlich geringere Werte als der Speichermodul. Da der Speichermodul stets überwiegt kann von einem festkörperartigen Hydrogel ausgegangen werden.

Thermoreversibilität

Um die reversiblen Eigenschaften der physikalischen Gelierung zu untersuchen, wurde das FF-Hydrogel 10 mal einem Temperaturzyklus unterzogen. Bei jedem Zyklus wurde das Hydrogel von 15 $^{\circ}\text{C}$ auf 37 $^{\circ}\text{C}$ erwärmt und auf 15 $^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Dabei wurde die Temperatur um 9 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ erhöht bzw. verringert. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.23a dargestellt und zeigt, dass das FF-Hydrogel seine thermoreversiblen Eigenschaften über mindestens 10 Temperaturzyklen behält. Bei jedem Zyklus verhält sich das FF-Hydrogel gleich und weist eine zunehmende Festigkeit bei steigender Temperatur auf. Wird die Temperatur gesenkt, verringert sich auch der Wert des Speichermoduls. Auffällig ist, dass sowohl der minimale als auch der maximale Speichermodul bei jedem Zyklus ansteigt, obwohl die 15 $^{\circ}\text{C}$ -Phase ausreichend lang gewählt wurde. Dies ist damit zu begründen, dass die Polymere sich nach jeder Abkühlphase neu ausrichten und sich im nächsten Zyklus stärker verhaken, wodurch eine festere Hydrogelstruktur erreicht wird.

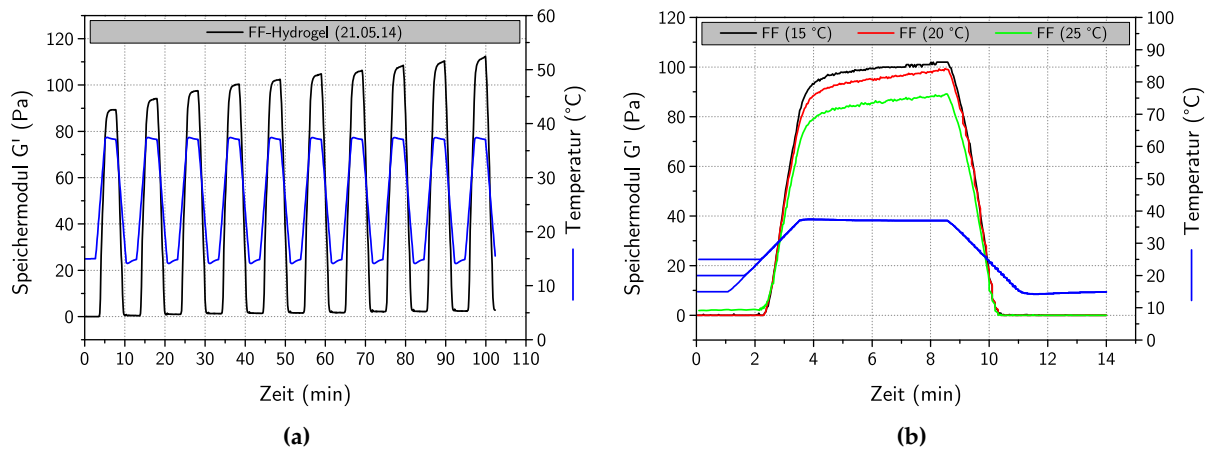


Abbildung 4.23 Einfluss der Temperatur auf die Festigkeit des FF-Hydrogels. Die Heiz- bzw. Kühlrate beträgt 9 °C/min. (a) 10 Temperaturzyklen von 15 °C → 37 °C → 15 °C bei 2 % Deformation und 1 Hz. (b) Ein Temperaturzyklus von 15 °C, 20 °C und 25 °C → 37 °C → 15 °C bei 2 % Deformation und 1 Hz.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Anfangstemperatur auf die Thermoreversibilität und Festigkeit der Hydrogele analysiert. Dazu wurde FF-Hydrogel ausgehend von 15 °C, 20 °C und 25 °C auf 37 °C erwärmt. Die Temperatur wurde bei 37 °C für 5 min konstant gehalten bevor sie auf 15 °C gesenkt wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.23b dargestellt. Bei allen drei Anfangstemperaturen ist ein ähnliches Verhalten des Speichermoduls zu beobachten. Je höher die Anfangstemperatur gewählt wird, umso niedriger ist der maximale Wert des Speichermoduls. Dies ist insbesondere bei der Anfangstemperatur von 25 °C zu erkennen. Da die kritische Gelierungstemperatur bereits zu Beginn des Zyklus erreicht ist, liegt der Speichermodul bei 2 Pa, während die Werte für 15 °C und 20 °C noch 0 Pa betragen. Nach der Temperierung auf 37 °C liegen bei 15 °C alle Hydrogele flüssig vor. Der Speichermodul beträgt 0 Pa. Die Ergebnisse zeigen, dass das Hydrogel fester wird, je geringer die Anfangstemperatur gewählt wird. Bei der Verkapselung von Zellen ist es technisch bisher jedoch nicht möglich, die Anfangstemperatur des Hydrogels definiert zu regeln, um unterschiedliche feste Hydrogelkonstrukte zu erhalten.

Einfluss von Temperatur und UV-Licht

Da das FF-Hydrogel durch Temperaturänderung reversibel und durch UV-Licht irreversibel vernetzt werden kann, wird im Folgenden der Einfluss der Temperatur als auch der Einfluss des UV-Lichts auf das Hydrogel untersucht. Dabei wurden FF-Hydrogele mit 0 %, 1 % und 2 % PEGDA mit der UV-Einheit des Rheometers analysiert. Die Ergebnisse werden beispielhaft am Hydrogel mit 1 % PEGDA erläutert.

Zunächst wurden die FF-Hydrogele von 15 °C auf 37 °C erwärmt. Anschließend wurden die Proben für 5 min mit UV-Licht bestrahlt und auf 15 °C abgekühlt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.24a dargestellt und zeigen, dass sich das Hydrogel, wie bereits in Abbildung 4.22a gezeigt, durch Temperaturerhöhung verfestigt. Im Vergleich werden allerdings nicht so hohe

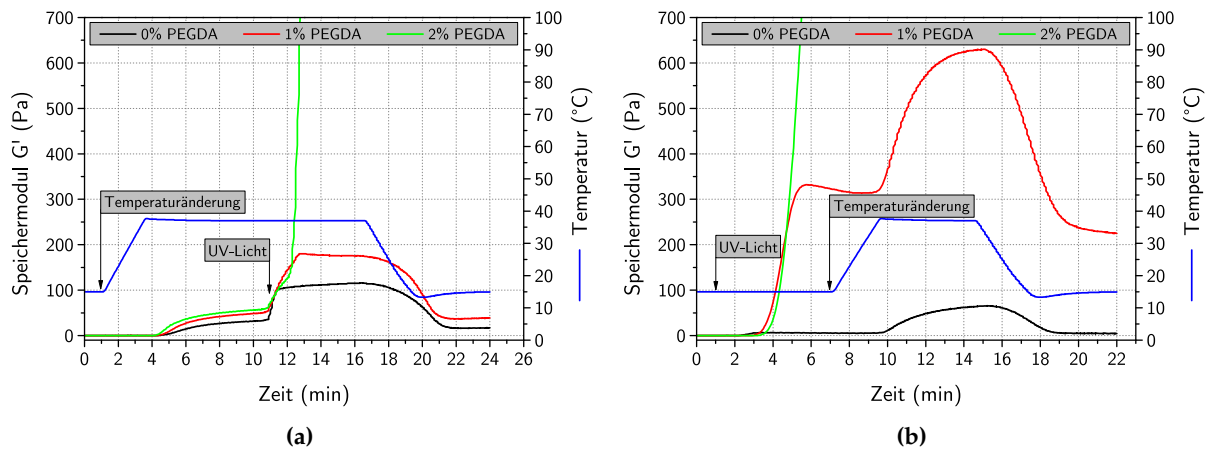


Abbildung 4.24 Einfluss der Temperatur und des UV-Lichts auf die Festigkeit des FF-Hydrogel. Die Heiz- bzw. Kühlrate beträgt 9 °C/min und die Bestrahlungzeit mit UV-Licht 5 min. (a) Speichermodul G' mit einem Temperatur-UV-Licht-Profil und (b) Speichermodul G' mit einem UV-Licht-Temperatur-Profil in Abhängigkeit der Zeit bei 2% Deformation und 1 Hz.

Speichermodul erreicht, was auf die UV-Einheit des Rheometers zurückzuführen ist. Die UV-Einheit besteht aus einer Quarzglasplatte und überträgt die Wärme nicht so effizient wie die Keramikplatte des Peltier-Elements. Dies führt zu einem höheren Wärmeverlust. Daher beträgt der Speichermodul unter Verwendung der UV-Einheit mit 1% PEGDA 50 Pa, während bei dem Peltier-Element 80 Pa erreicht werden. Durch die anschließende Bestrahlung mit UV-Licht verfestigt sich das Hydrogel (1% PEGDA) noch einmal auf 180 Pa. Mit dem Absenken der Temperatur auf 15 °C werden auch die Quervernetzungen des Hydrogels weitgehend zerstört, da die kovalenten Bindungen bei der UV-Bestrahlung auf der physikalischen Gelierung basieren. Löst sich die physikalische Gelierung auf, bleibt die ursprüngliche Festigkeit des Hydrogels nicht erhalten und der Speichermodul sinkt. Bei dem Hydrogel mit 1% PEGDA liegt der Speichermodul nach Absenken der Temperatur bei 39 Pa.

Zum Vergleich wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, bei dem die Hydrogele in umgekehrter Reihenfolge zunächst 5 min mit UV-Licht bei 15 °C bestrahlt und anschließend auf 37 °C erwärmt wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.24b gezeigt. Hierbei ist festzustellen, dass im Vergleich zum vorherigen Experiment bei allen 3 Messungen insgesamt höhere maximale Speichermodul erreicht werden. Durch das UV-Licht bildet sich bereits eine feste Hydrogelstruktur aus. Bei dem FF-Hydrogel mit 1% PEGDA beträgt der Speichermodul nach der UV-Bestrahlung 319 Pa und steigt durch die Temperaturerhöhung auf 630 Pa. Nach der Abkühlung der Probe auf 15 °C weist der Speichermodul noch 225 Pa auf. Das bedeutet, dass die Hydrogelkonstrukte an Festigkeit zunehmen, wenn sie nach der Polymerisation bei 37 °C inkubiert werden.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass durch rheologische Untersuchungen von Hydrogelen zum einen Viskositätsfunktionen aufgenommen werden konnten und Viskositätsbereiche für die Herstellung von Mikropartikeln mittels des Encapsulators definiert werden konnten. Zum anderen konnten komplette Polymerisationsprozesse durch Temperaturän-

derungen oder Bestrahlung der Fibrinogen-basierten Hydrogele mit UV-Licht durchgeführt werden. Dies ermöglicht es das mechanische Verhalten von Hydrogelen und deren Festigkeit zu analysieren. Dabei ist jedoch der direkte Vergleich zwischen den Hydrogelkonstrukten, die mit dem Rheometer untersucht werden und denen, die für die Zellkultivierung zur Anwendung kommen schwierig (Abschnitt 4.4), da sich die Leistungen der verwendeten UV-Lampen unterscheiden.

In den folgenden Abschnitten werden nun lebende Zellen in die rheologisch charakterisierten Hydrogele eingeschlossen und kultiviert. In Abschnitt 4.3 werden Hefezellen in Ca-Alginat-Mikropartikel mittels Encapsulator immobilisiert und deren Wachstum mittels Bildverarbeitung ausgewertet. In Abschnitt 4.4 werden tierische Zellen in PF- und FF-Hydrogelen kultiviert.

4.3 Verkapselung und Kultivierung von *S. cerevisiae* in Mikropartikeln

Wie in den Abschnitten 4.1.3 und 4.1.4 gezeigt, können mittels des Encapsulators sowohl monodisperse Mikropartikel als auch Core-Shell-Mikrokapseln aus Na-Alginat hergestellt werden. Daher wurde untersucht, ob die Verkapselungsbedingungen milde genug sind, um lebende Zellen zu verkapseln und anschließend zu kultivieren. Als Modellorganismus wurde die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* verwendet und in Mikropartikeln und Mikrokapseln aus Na-Alginat kultiviert. Hefezellen sind robust und weisen eine geringe Verdopplungszeit auf, so dass das Wachstum tierischer Zellen in kurzer Zeit simuliert werden kann. Außerdem benötigen die Zellen eine hohe Konzentration an Nährstoffen. Dadurch können mögliche Limitierungen innerhalb der Partikel schneller detektiert werden. Neben der Beschreibung des Zellwachstums war das Ziel außerdem, eine möglichst lange Kultivierung durchzuführen und eine hohe Zellkonzentration in den Partikeln zu erreichen. Zur Beurteilung des Kultivierungsverlaufs wurde die Zellzahl in den Mikropartikeln bestimmt und die Partikel mittels Bildverarbeitung ausgewertet.

Um eine möglichst hohe Zellkonzentration in den Mikropartikeln zu erreichen, musste für die Verkapselung zunächst eine optimale Zellkonzentration ermittelt werden. Eine zu hohe Zellkonzentration in den Mikropartikeln kann dazu führen, dass bereits frühzeitig eine Nährstofflimitierungen eintritt und das Wachstum ausbleibt. Des Weiteren können Zellcluster, die übereinander liegen, mittels Bildverarbeitung nicht detektiert werden und würden zu einem falschen Ergebnis führen. Wird hingegen die Zellkonzentration zu niedrig gewählt, steigt die Anzahl der Partikel an, in denen keine Zellen verkapselt sind. Dies würde zu schlechten Raum-Zeit-Ausbeuten führen. Es gilt daher, die Zellkonzentration und die Parameter zur Verkapselung so zu wählen, dass durchschnittlich etwa 1-2 Zellen pro Mikropartikel immobilisiert werden.

Tabelle 4.3 Parameter und Ergebnisse einer Kultivierung von Mikropartikeln und Core-Shell-Mikrokapseln

Partikeltyp	Mikropartikel	Mikrokapsel-Core	Mikrokapsel-Shell
Düsengröße	200 µm	120 µm	200 µm
Zellkonzentration	0,1 Mio. Z/mL	0,1 Mio. Z/mL	—
Flussrate/Druck	4 mL/min	0,5 mL/min	470 mbar
Frequenz	600 Hz		600 Hz
Anteil zellfreier Partikel	0 %		39 %
Ø Zellen pro Partikel (0 h)	< 8 Zellen/Partikel		< 2 Zellen/Partikel
Ø Zellen pro Partikel (27 h)	> 19 000 Zellen/Partikel		> 67 000 Zellen/Partikel

Alle Kultivierungen wurden mit einem definiertem Partikelvolumen in einem 250 mL Erlenmeyerkolben mit 100 mL Medium bei 28 °C und 150 rpm durchgeführt (Abschnitt B.3.1). Um die Kultivierungen beschreiben zu können, wurden neben mikroskopischen Aufnahmen die Zellzahl sowie die Glucose- und Ethanolkonzentration an unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. Zur Bestimmung der Zellzahl innerhalb der Mikropartikel wurde ein definiertes Volumen an Mikropartikeln aufgelöst und die Zellzahl mittels Zellzähler bestimmt. Außerdem wurde die Zellzahl in Suspension bestimmt (Abschnitt B.6).

4.3.1 Vergleich einer Kultivierung mit Mikropartikeln und Core-Shell-Mikrokapseln

Zum Vergleich einer Kultivierung mit Mikropartikeln und Core-Shell-Mikrokapseln wurden Ca-Alginat-Partikel mit Hefezellen bei identischen Parametern produziert und anschließend kultiviert. Die Mikropartikel wurden mit einer 200 µm Düse, bei 600 Hz und mit einer Zellkonzentration von 0,1 Mio. Z/mL Na-Alginatlösung hergestellt. Für die Core-Shell-Mikrokapseln wurde zusätzlich eine 120 µm Düse und eine zellfreie Na-Alginatlösung als Shell-Lösung verwendet. Um jeweils Mikropartikel und Mikrokapseln gleicher Größe zu generieren, wurde die Flussrate bzw. der angelegte Druck entsprechend angepasst. Die Mikropartikel wiesen eine durchschnittliche Größe von 510 µm (69,5 nL) mit 8 Zellen/Partikel auf, während bei den Core-Shell-Mikrokapseln ein Durchmesser von 540 µm (82,4 nL) mit 2 Zellen/Partikel ermittelt wurde. Die deutlich geringere Zellzahl in den Mikrokapseln resultiert aus dem geringen Core-Volumen, um gleich große Mikropartikel erzeugen zu können. Die Parameter und Ergebnisse der Kultivierungen sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

In Abbildung 4.25 sind mikroskopische Aufnahmen der Kultivierungen an verschiedenen Zeitpunkten gezeigt. Es ist zu erkennen, dass bei beiden Kultivierungen die verkapselten Hefezellen nach 15 h zu kleinen Zellclustern herangewachsen sind. Allerdings werden erst im weiteren Verlauf der Kultivierung Unterschiede deutlich. Bei den Mikropartikeln, die mit dem Eindüsensystem hergestellt wurden, liegen im Vergleich zu den Core-Shell-Mikrokapseln, die mit dem konzentrischen Düsensystem generiert wurden, wesentlich mehr Zellen in Suspension vor. Dies wird insbesondere in Abbildung 4.26 deutlich, in der die Erlenmeyerkolben nach einer

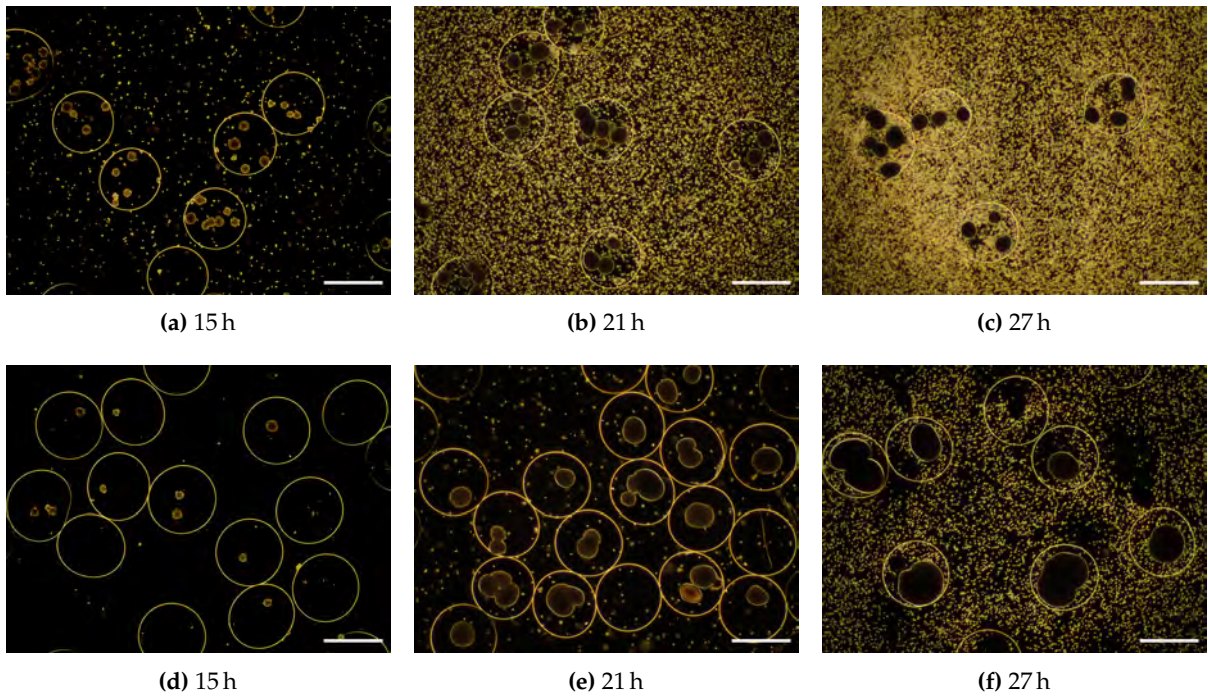


Abbildung 4.25 Vergleich mikroskopischer Aufnahmen einer Kultivierung mit (a-c) Mikropartikeln und (d-f) Core-Shell-Mikrokapseln zu verschiedenen Zeitpunkten, Messbalken: 500 μm .

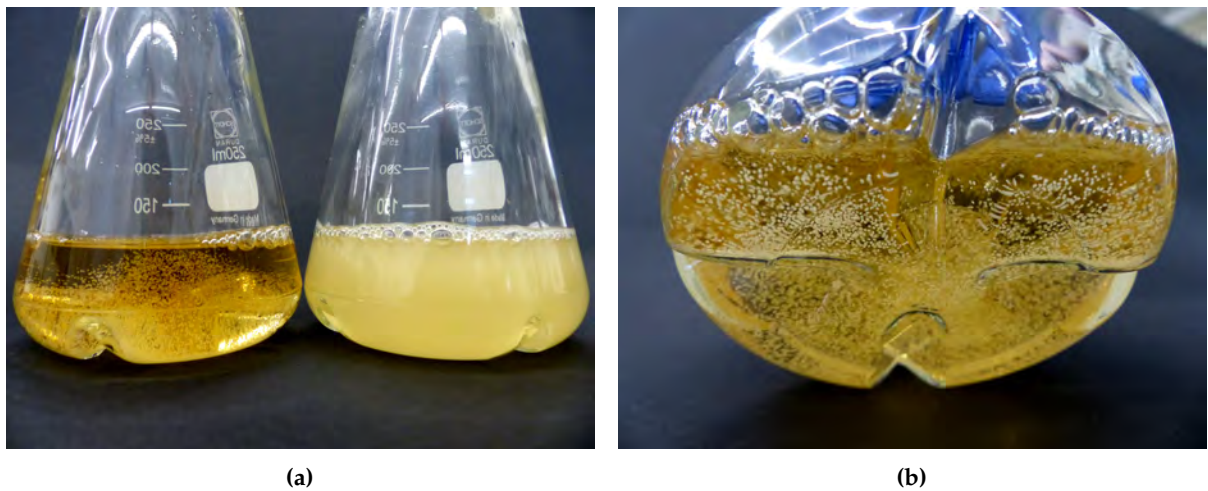


Abbildung 4.26 Vergleich einer Kultivierung mit (a, links) Core-Shell-Mikrokapseln und (a, rechts) Mikropartikeln nach 21 h. Während das Medium der CSM-Kultivierung transparent erscheint, ist das Medium der Mikropartikelkultivierung bereits stark getrübt. (b) Detailaufnahme der CSM-Kultivierung. Die Mikrokapseln sind als helle Punkte sichtbar. (c) QR-Code zu einer Zeitrafferaufnahme von Hefezellen in Core-Shell-Mikrokapseln über 36 h. Die Bilder wurden mittels LumaScope 600, 4-fach Objektiv und einem Zeitintervall von 120 s erzeugt.

Kultivierungsdauer von 21 h vergleichend dargestellt sind. Während das Medium mit den Mikropartikeln aufgrund der hohen Konzentration an Suspensionszellen bereits stark getrübt ist, ist das Medium mit den Core-Shell-Mikrokapseln durchsichtig. Die hohe Konzentration an Suspensionszellen bei der Mikropartikel-Kultivierung ist auf die unterschiedliche Verkapselungstechnik zurückzuführen. Bei dem Eindüsen-System werden Zellen auch an der Oberfläche eines Partikels verkapselt. Durch die Rotationsbewegungen des Kulturgefäßes können sich die Zellen leicht von der Partikeloberfläche ablösen und ins Medium abgegeben werden. Andererseits können Zellen mit dem konzentrischen Düsensystem in der Mitte des Mikropartikels positioniert werden. Die Zellen haben keinen direkten Zugang zum Medium und werden nicht durch Scherkräfte freigesetzt. Bei ungünstiger Positionierung können Zellen in seltenen Fällen ebenfalls ins Medium gelangen, weshalb auch bei der Kultivierung der Mikrokapseln Zellen in Suspension auftreten. Zellen, die in Suspension vorliegen, haben direkten Kontakt mit dem Medium und können sich uneingeschränkt teilen. Mikrokapseln mit einer hohen Zellzahl, die nach etwa 24 h erreicht ist, können aufgrund mangelnder Partikelstabilität platzen und die Zellen gleichermaßen freisetzen. Dennoch sind nach einer Kultivierungsdauer von 27 h bei den Mikrokapseln deutlich weniger Zellen in Suspension vorhanden als bei der Kultivierung mit den Mikropartikeln. Des Weiteren ist zu beobachten, dass die Hefecuster in den Mikropartikeln nach 21 h nicht mehr größer werden, wohingegen die Zellcluster der Mikrokapseln noch deutlich an Fläche zunehmen. Um eine detaillierte Vorstellung des Zellwachstums in den Core-Shell-Mikrokapseln zu bekommen, wurde eine mikroskopische Zeitrafferaufnahme der Mikropartikel erstellt. Dazu wurden mittels LumaScope 600 (Etaluma Inc.) alle 2 Minuten Bilder von den Mikrokapseln erzeugt und anschließend zusammengefügt. Das Video der Kultivierung kann über Abbildung 4.26c abgerufen werden.

Die optisch getroffenen Aussagen können durch weitere Analysen untermauert werden. Dazu wurde die Zellkonzentration innerhalb der Partikel und in Suspension sowie die Glucose- und Ethanolkonzentration während der Kultivierung bestimmt. Die Daten sind in Abbildung 4.27 dargestellt. Anhand der Zellkonzentration (Abb. 4.27a) wird deutlich, dass die Zellen in den Mikropartikeln im Vergleich zu den Core-Shell-Mikrokapseln weniger gewachsen sind. Trotz der höheren Anfangszellzahl von 8 Zellen/Partikel lag die maximale Zellkonzentration nach 27 h nur bei 19 000 Zellen/Partikel, während die Suspensionszellzahl bei 15,1 Mio. Z/mL lag. Im Vergleich dazu begann die Kultivierung der Core-Shell-Mikrokapseln mit gerade einmal 2 Zellen/Partikel und wuchs durchschnittlich auf über 67 000 Zellen/Partikel. Der Anteil an zellfreien Kapseln blieb dabei unbeachtet. Unter Berücksichtigung der zellfreien Mikrokapseln (39 %) beträgt die Zellzahl sogar über 110 000 Zellen/Partikel. Bei der Kultivierung der Mikrokapseln wurde eine maximale Zellkonzentration in Suspension von 7,3 Mio. Z/mL ermittelt (27 h). Durch den Verlauf der Glucosekonzentration (Abb. 4.27b) wird deutlich, dass bei der Mikropartikel-Kultivierung aufgrund der höheren Suspensionszellzahl früher eine Glucoselimierung eintritt. Die Zellen in Suspension verbrauchen verhältnismäßig viel Glucose, während die immobilisierten Hefezellen infolge des Diffusionsgradienten früher einer Nährstofflimierung ausgesetzt sind. Daher konnte nach 21 h kein Wachstum mehr beobachtet werden.

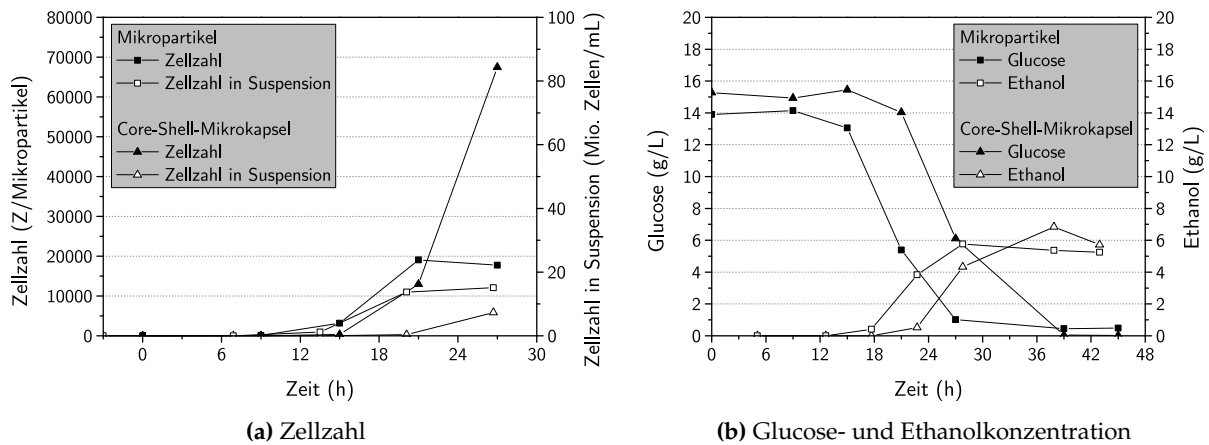


Abbildung 4.27 Vergleich einer Kultivierung mit Mikropartikeln und Core-Shell-Mikrokapseln: **(a)** Zellzahl in den Mikropartikeln bzw. Mikrokapseln und in Suspension ($SD < 8\%$) und **(b)** Glucose- und Ethanolkonzentrationen der Kultivierungen ($SD < 12\%$) in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer.

Antiparallel zur Glucosekonzentration steigt die Ethanolkonzentration im Kulturmedium. Es ist zu erkennen, dass bei der Kultivierung mit Mikropartikeln die Bildung von Ethanol deutlich früher beginnt als bei der Mikrokapsel-Kultivierung. Ethanol wird erst verstoffwechselt, wenn die Glucose vollständig von den Zellen umgesetzt wurde.

Es konnte gezeigt werden, dass bei dem Verkapselungsprozess mittels Encapsulator milde Bedingungen herrschen, so dass lebende Hefezellen verkapselt werden können. Die immobilisierten Zellen wachsen unabhängig von der verkapselten Position in Form deutlich sichtbarer, runder Zellcluster. Ein Vergleich zwischen den beiden Kultivierungen ist aufgrund der unterschiedlichen Partikeldurchmesser und Anzahl verkapselter Zellen pro Mikropartikel nur eingeschränkt möglich. Dennoch konnte gezeigt werden, dass mit dem Core-Shell-System Mikrokapseln erzeugt werden können, mit denen höhere Zellkonzentrationen erzielt werden können als mit einer Kultivierung mit Mikropartikeln. Dies ist hauptsächlich auf die Position der Hefezellen in den Mikrokapseln zurückzuführen. Allerdings können bereits wenige deformierte Mikrokapseln ausreichend Zellen freisetzen, so dass die Suspensionszellzahl deutlich ansteigt. Somit kann die Freisetzung von Zellen in das Medium nicht gänzlich verhindert werden. Das Core-Shell-System ermöglicht jedoch eine deutliche Verzögerung des Zellaustritts, wobei das Ausmaß der Verzögerung in direktem Zusammenhang mit der Position der verkapselten Zellen in den Mikrokapseln steht.

4.3.2 Auswertung einer Kultivierung mittels Bilderverarbeitung

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit und zur Auswertung einer Kultivierung mit Core-Shell-Mikrokapseln mittels Bildverarbeitung, wurde eine weitere Kultivierung mit identischen Parametern und erhöhter Probenanzahl durchgeführt. Dabei wurden neben dem Partikeldurchmesser auch die Flächen der Hefecuster detektiert. Anhand der Daten wurde die Zellzahl der Partikel berechnet und mit offline-Messwerten verglichen.

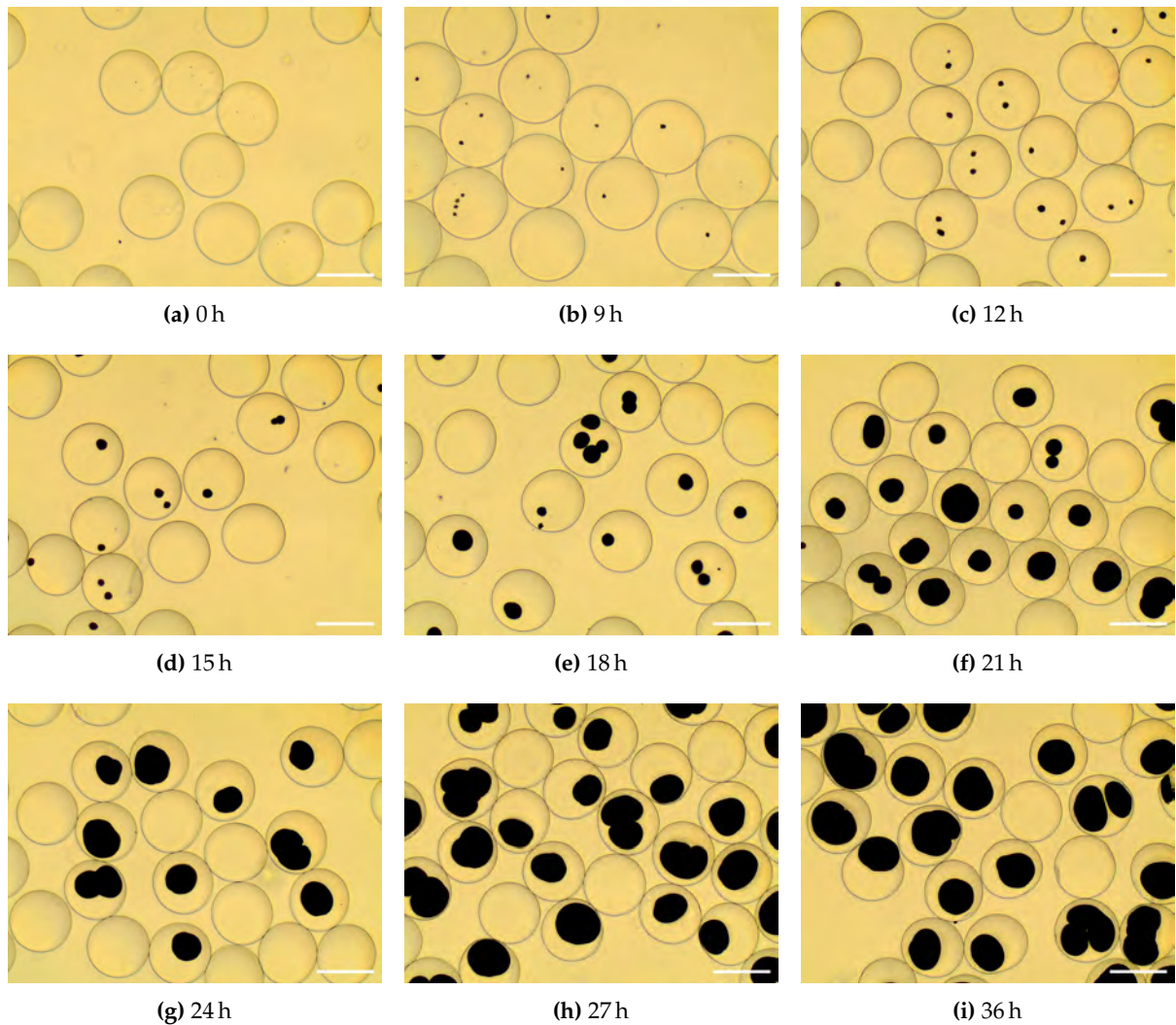


Abbildung 4.28 Mikroskopische Aufnahmen von Core-Shell-Mikrokapseln mit verkapselten Hefezellen zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten, Messbalken: 500 μm .

In Abbildung 4.28 sind die mikroskopischen Aufnahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung gezeigt. Direkt nach der Verkapselung (Abb. 4.28a) sind die immobilisierten Hefezellen lediglich auf Phasenkontrastaufnahmen gut zu erkennen. Dies ermöglicht zwar die Detektion der Zellen, jedoch kann aufgrund der geringen Zellkonzentration zu diesem Zeitpunkt kaum eine Aussage über die Qualität der hergestellten Core-Shell-Systeme gemacht werden. Die Mikroskopbilder zeigen, dass sich die Fläche der Hefecuster in den Mikrokapseln mit der Kultivierungsdauer deutlich vergrößert, bis sie schließlich nach 27 h (Abb. 4.28h) einen großen Teil der Mikrokapseln eingenommen haben.

In Abbildung 4.29 sind die Ergebnisse der manuellen Zellzahlbestimmung sowie der Verlauf der Glucose- und Ethanolkonzentration dargestellt. Bei der Verkapselung wurden durchschnittlich 1,5 Zellen/Partikel immobilisiert, die nach 27 h eine maximale Zellzahl von über 66 000 Zellen/Partikel erreichten. Bei der vorherigen Kultivierung lag die maximale Zellzahl bei 67 000 Zellen/Partikel. Die Suspensionszellzahl erreichte eine Konzentration von

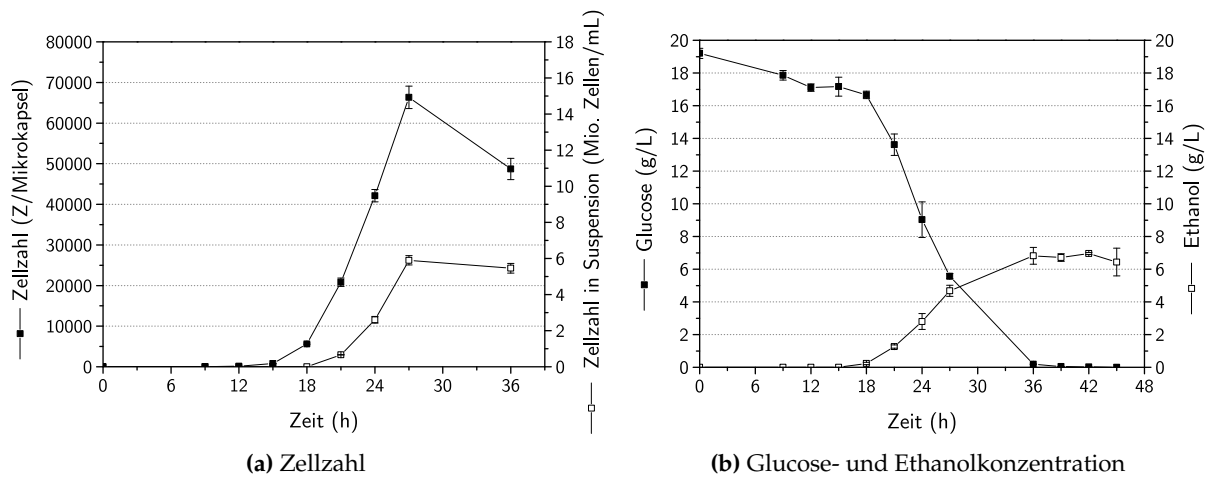


Abbildung 4.29 Darstellung des Zellwachstums und Verlauf der Glucose- und Ethanolkonzentration einer Kultivierung von Core-Shell-Mikrokapseln in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer.

5,9 Mio. Z/mL und liegt im Vergleich zur vorherigen Kultivierung minimal niedriger. Auch beim Partikeldurchmesser konnten die Ergebnisse reproduziert werden. Der mittlere Durchmesser dieser Kultivierung lag bei $550\ \mu\text{m}$ und weicht damit lediglich um $10\ \mu\text{m}$ von der vorherigen Kultivierung ($540\ \mu\text{m}$) ab. Die Glucose- und Ethanolkonzentration verläuft ebenfalls analog zur bereits gezeigten Kultivierung. Bei beiden Kultivierungen ist die Glucose nach rund 30 h verbraucht, wobei jeweils $7\ \text{g/L}$ Ethanol gebildet werden. Aus den Daten lässt sich schlussfolgern, dass bei der Verkapselung von Hefezellen in Ca-Alginat-Mikrokapseln und anschließender Kultivierung reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden können.

Die Weiterentwicklung der Software Graphic Analyzer (Abschnitt 4.1.2) ermöglichte es, nicht nur die Durchmesser der Mikropartikel zu bestimmen, sondern auch die Flächen einzelner Hefecuster zu detektieren und diese den Mikropartikeln zuzuordnen. Zur Detektion der Hefecuster wurden aufgrund des stärkeren Kontrastes Phasenkontrastbilder herangezogen. Anschließend wurde ein Ergebnisbild generiert, auf dem die detektierten Partikel und Zellcluster farblich hinterlegt sind. Im optimalen Fall wird ein Mikropartikel durch seinen Durchmesser und durch die Anzahl sowie Flächen der jeweiligen Zellcluster charakterisiert. Die Ergebnisbilder nach der vollständigen Bildverarbeitung sind exemplarisch für die Kultivierung in Abbildung 4.30 dargestellt.

Es wird deutlich, dass sowohl der Partikeldurchmesser als auch die Flächen der Zellcluster zu allen Kultivierungszeitpunkten von der Software bestimmt werden konnten. Lediglich nach 36 h werden durchschnittlich weniger Partikel bzw. Zellcluster vom Algorithmus detektiert. Dies ist auf den geringen Abstand und den fehlenden Kontrast der Zellcluster zum Partikelrand zurückzuführen. Insgesamt kann mit Hilfe der automatisierten Bildverarbeitung eine große Datenmenge mit einer Vielzahl an Stichproben erzeugt werden.

In Abbildung 4.31a ist neben der manuell bestimmten Zellzahl pro Mikropartikel die detektierte Fläche der Zellcluster gegen die Kultivierungszeit aufgetragen. Während sich die Zellzahl

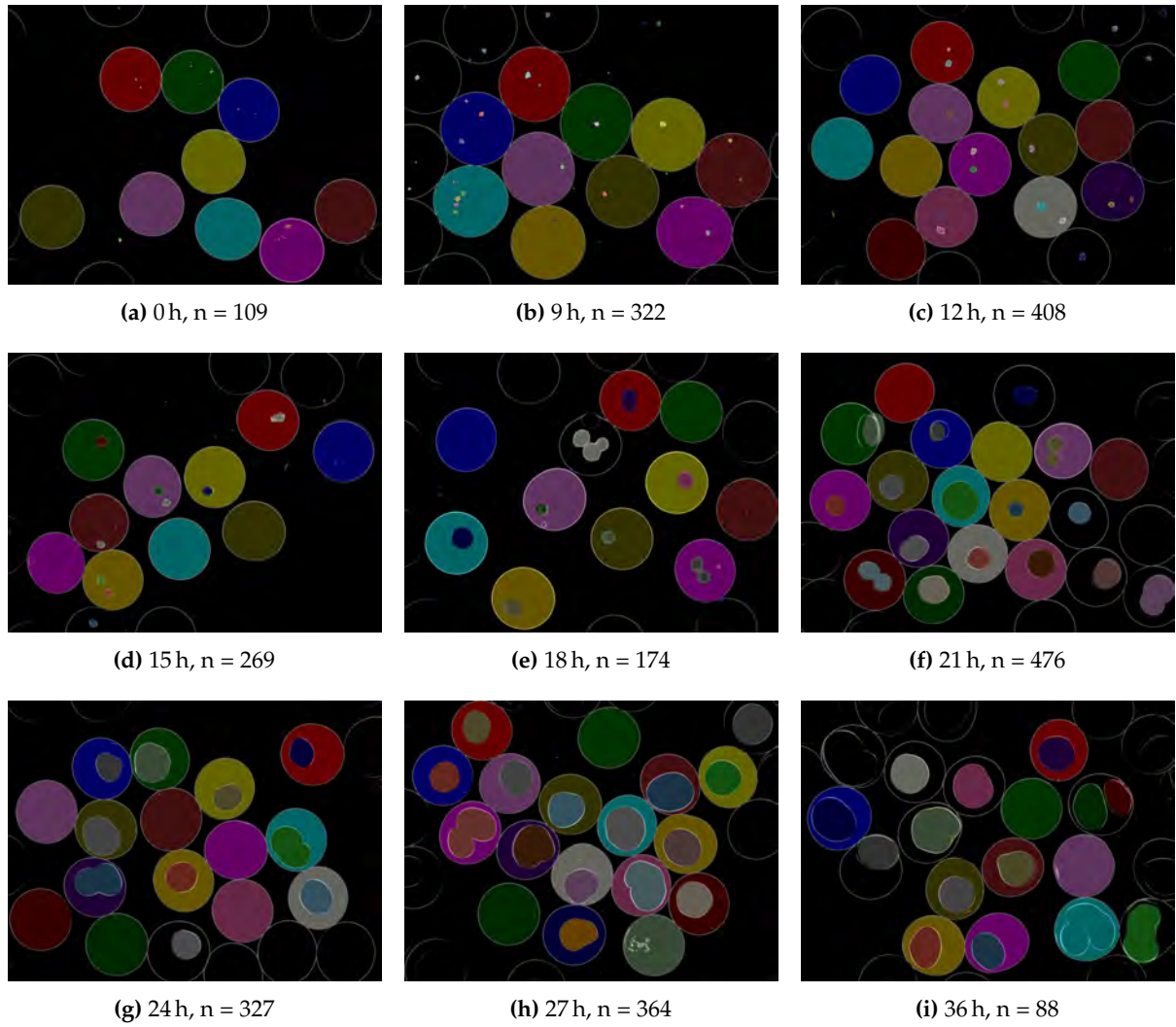


Abbildung 4.30 Ergebnisbilder der Auswertung mittels Bildverarbeitung zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer Kultivierung von Core-Shell-Mikrokapseln. Die Stichprobenanzahl bezieht sich auf detektierte Partikel.

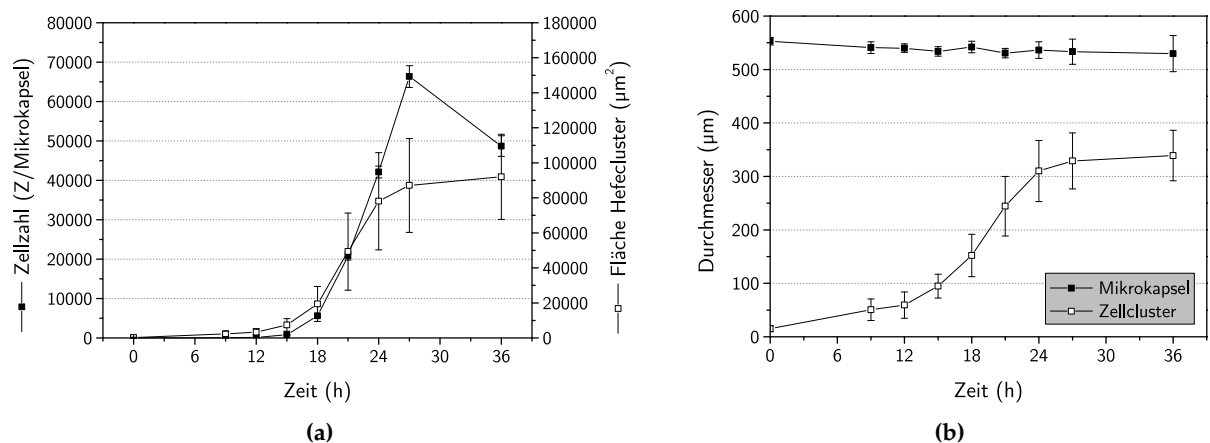


Abbildung 4.31 (a) Manuell bestimmte Zellzahl pro Mikrokapsel und detektierte Fläche der Hefecuster in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer und (b) die mittels Bildverarbeitung bestimmten mittleren Durchmesser der Mikrokapseln und Zellcluster in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer.

nach 27 h deutlich verringert, nimmt die Zellclusterfläche hingegen leicht zu. Um diese gegenläufige Tendenz erklären zu können, wird zunächst die Berechnung der Zellzahl über die Zellclusterfläche erläutert. Dazu wurde anhand der detektierten Flächen der mittlere Partikel sowie der durchschnittliche Zellclusterdurchmesser bestimmt. Dabei wurde angenommen, dass die Hefezellen als kugelförmige Zellcluster wachsen. Die berechneten Durchmesser der Mikrokapseln und Zellcluster sind in Abbildung 4.31b veranschaulicht. Es ist zu erkennen, dass im Verlauf der Kultivierung der Partikeldurchmesser geringfügig von durchschnittlich $550\ \mu\text{m}$ ($t = 0\ \text{h}$) auf $530\ \mu\text{m}$ ($t = 36\ \text{h}$) sinkt. Hingegen nimmt der Durchmesser der Zellcluster kontinuierlich zu, bis nach 27 h ein nahezu konstanter Wert erreicht ist. Diese Beobachtungen stimmen auch mit den mikroskopischen Aufnahmen, die in Abbildung 4.28 gezeigt wurden, überein. Da die Fläche der Zellcluster bzw. die Zellzahl innerhalb der Mikrokapseln steigt, die Mikrokapseln allerdings nicht an Größe zunehmen, ist davon auszugehen, dass die Hefezellen das Wasser in den Ca-Alginat-Mikrokapseln verdrängen und sich die Polymerstruktur dadurch komprimiert. Außerdem ist es denkbar, dass die Hefezellen das Alginat abbauen und als weitere Nährstoffquelle verwenden.

Zur Bestimmung der Zellzahl pro Mikrokapsel anhand der detektierten Zellclusterflächen wurde das Volumen der Hefecuster pro Mikrokapsel mithilfe der Durchmesser (Abb. 4.31b) berechnet. Außerdem wurde das Volumen der Hefezellen unter Berücksichtigung des Zelldurchmessers (Abb. 4.32a) für die entsprechenden Kultivierungszeiten ermittelt. Unter der Annahme einer kubisch flächenzentrierten Anordnung der Hefezellen im Zellcluster (dichteste Kugelpackung, 74 %) wurde aus dem Volumen der Zellcluster sowie aus dem Volumen der Hefezellen die durchschnittliche Zellzahl pro Mikrokapsel berechnet. Die Zellzahl pro Mikrokapsel wurde somit in Abhängigkeit der Zellgröße und dem Kultivierungszeitpunkt bestimmt. In Abbildung 4.32b wird die Zellzahl pro Mikrokapsel, die anhand der Zellclusterflächen bestimmt wurde, mit den manuell bestimmten offline-Messwerten verglichen. Hierbei ist festzustellen, dass die über den Algorithmus berechnete Zellzahl gut mit den manuell bestimmten Zellzahlen korreliert. Nach einem exponentiellen Wachstum ist deutlich zu erkennen, dass die Zellzahl nach 27 h rückläufig ist. Dies konnte alleine durch die detektierte Zellclusterfläche nicht gezeigt werden (Abb. 4.31a), da diese aufgrund der größer werdenden Hefezellen nach 27 h noch geringfügig steigt. Somit ist es für eine korrekte Zellzahlbestimmung unumgänglich, auch die Größe der Hefezellen zu berücksichtigen. Eine Bestimmung der Zellzahl pro Mikrokapsel ist demnach nur dann möglich, wenn Informationen zur Zellgröße vorliegen.

Anhand der Kultivierungsergebnisse konnte gezeigt werden, dass der Verkapselungsprozess und Kultivierungen reproduzierbar durchgeführt werden können. Die Anwendung des bildbasierten Algorithmus zur Bestimmung der Mikrokapsel- und Zellclusterflächen stellt eine effektive Möglichkeit dar, eine größere Probenmenge automatisiert zu detektieren und zu analysieren. Über die detektierten Flächeninhalte kann neben dem mittleren Durchmesser auch das durchschnittliche Volumen der Mikrokapseln und Zellcluster berechnet werden. Wie in Abbildung 4.32b dargestellt, kann unter der Annahme der dichtesten Kugelpackung und der Zellgröße mit einer guten Näherung der Kultivierungsverlauf wiedergegeben werden.

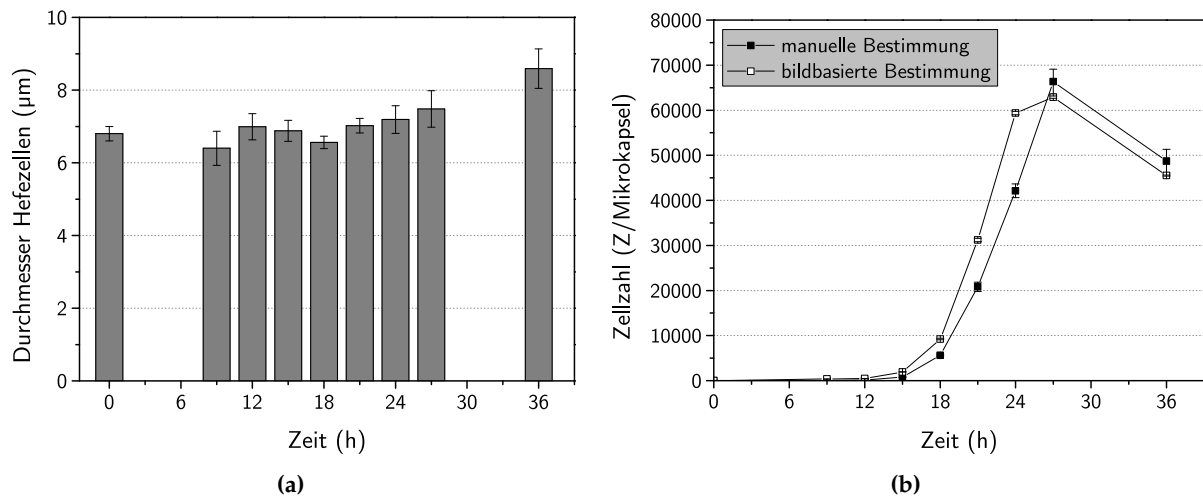


Abbildung 4.32 (a) Durchmesser der verkapselten Hefezellen in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer und (b) Vergleich der manuell bestimmten Zellzahl mit der über die Bildverarbeitung berechneten Zellzahl in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer.

Es ist denkbar, die Zellzahl innerhalb der Partikel auch mit einer nicht invasiven Methode, wie beispielsweise der in-situ-Mikroskopie zu ermitteln [85, 86]. Dies würde die Bestimmung der Zellzahl in einer hohen Frequenz ermöglichen, ohne dass eine Probe aus dem Bioreaktor entnommen werden muss. Darüber hinaus könnte der Algorithmus an die Zellzahlbestimmung von Sphäroidkulturen tierischer Zellen angepasst werden und würde somit ein großes Potential für biotechnologische Anwendungen darstellen.

4.4 Immobilisierung und Kultivierung tierischer Zellen in 3D Hydrogelsystemen

Die vorherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass robuste Hefezellen in Ca-Alginat-Partikel verkapselt und kultiviert werden können. Daher wurde anschließend die Immobilisierung und Kultivierung tierischer Zellen in soliden 3D Hydrogelsystemen untersucht. Im ersten Teilabschnitt werden zunächst verschiedene Zelllinien und Primärzellen in einem photosensitiven PF-Hydrogel eingeschlossen und deren Zellwachstum beschrieben. Außerdem wird eine Methode zur Quantifizierung von Zellen in soliden 3D Systemen vorgestellt.

Im zweiten Abschnitt wird das Zellwachstum mesenchymaler Stammzellen (MSC) sowie das Differenzierungsvermögen in Fibrinogen-basierten Hydrogelen näher analysiert und beurteilt. Des Weiteren wird das Quell- bzw. Kontraktionsverhalten von Hydrogelen gezeigt und untersucht, ob die Festigkeit der Hydrogele einen Einfluss auf das Wachstum der MSC bzw. auf Zellsphäroide hat. Das Hauptaugenmerk lag auf der Untersuchung des PF-Hydrogels, während das Zellwachstum im FF-Hydrogel nur grundlegend charakterisiert wurde. In den letzten beiden Abschnitten werden Säugetierzellen mittels Encapsulator in Mikropartikeln und Core-Shell-Mikrokapseln immobilisiert und kultiviert.

4.4.1 Wachstumsverhalten unterschiedlicher Zelllinien in einem PF-Hydrogel

Zellen, die in einer Gewebekulturflasche in einem Monolayer als 2D Kultur wachsen, weisen je nach Zelllinie eine unterschiedliche Zellmorphologie auf. Daher wurde untersucht, ob sich die Morphologie auch voneinander unterscheidet, wenn die Zellen in einem soliden 3D Hydrogelsystem wachsen. Dazu wurden 4 Zelllinien gewählt, die bereits in 2D Kultur deutliche morphologische Unterschiede aufzeigen (Abschnitt A.1). Neben einer Suspensionszelllinie (CHO-K1) wurde eine humane Krebszelllinie Hep-G2 (hepatozelluläre Karzinomzellen) sowie die Zelllinie NIH-3T3 (murine embryonale Fibroblasten) gewählt. Außerdem wurden humane mesenchymale Stammzellen (MSC), die aus Fettgewebe isoliert wurden (Abschnitt B.1.4), in soliden PF-Hydrogelen untersucht. Zur Herstellung solider 3D Hydrogelkonstrukte wurde eine reproduzierbare Methode etabliert, die es ermöglicht vielfältige Untersuchungen durchzuführen (Abschnitt B.4). Die Hydrogelkonstrukte mit einem Volumen von 50 μL und einer Zelldichte von 1 Mio. Z/mL Hydrogel wurden für 7 Tage bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert.

In Abbildung 4.33 sind mikroskopische Aufnahmen der kultivierten Zellen nach 1, 4 und 7 Tagen dargestellt. Dabei ist bereits visuell festzustellen, dass alle untersuchten Zelllinien im PF-Hydrogel proliferieren. Wie in einer 2D Kultur (Abb. A.1) zeigen die Zelllinien auch in den soliden Hydrogelkonstrukten unterschiedliche Zellmorphologien. Während die CHO-K1- und Hep-G2-Zellen clusterförmig als Zellsphäroide wachsen, bilden die NIH-3T3 und MSC in den soliden PF-Hydrogelkonstrukten netzartige Zellstrukturen aus. Als Suspensionszellen haben die CHO-K1-Zellen ihre Fähigkeit zur Adaption auf Oberflächen oder in Hydrogelkonstrukten verloren und bilden runde Sphäroide aus. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Sphäroiddurchmesser mit der Kultivierungsdauer zunimmt und die Zellen auch in verschiedenen Ebenen des Hydrogelkonstruktes wachsen. Auch die Hep-G2-Zellen wachsen in dem Hydrogel als kompakte Sphäroide und weisen ein geringes Migrationsvermögen auf. Diese Morphologie spiegelt sich auch in der 2D Kultur wider. In einer zweidimensionalen Kultur breiten sich die Zellen weniger auf der Oberfläche aus, sondern wachsen hauptsächlich als Zellaggregat. Die Fibroblastenzellen und MSC bilden hingegen in den Hydrogelkonstrukten innerhalb von 7 Tagen ein dreidimensionales Zellnetzwerk aus. Nach dem Verkapseln der Zellen in ein Hydrogelkonstrukt liegen die Zellen vereinzelt als runde Zellen vor. Innerhalb von 24 h beginnen die Zellen jedoch damit im Hydrogel zu adhären. Die Zellen nehmen eine länglich-ovale Zellform ein. Nach 4 Tagen sind deutliche Zell-Zell-Kontakte zu anderen Zellen zu erkennen und die Zellen beginnen damit sich dreidimensional im Hydrogelkonstrukt zu vernetzen. Nach einer Kultivierungsdauer von 7 Tagen sind die Zellen zu einem kompakten dreidimensionalen Zellnetzwerk gewachsen.

Es wurde gezeigt, dass die untersuchten Zelllinien und MSC im PF-Hydrogel teilweise unterschiedliche Zellmorphologien aufweisen. Insgesamt weisen die Zelllinien im Vergleich zur 2D Kultur (Abb. A.1) in dem 3D System eine vergleichbare Morphologie auf. Der Hauptunterschied zu einer 2D Kultur liegt jedoch darin, dass die Zellen in einem dreidimensionalen Hydrogelkonstrukt in alle Richtungen wachsen und interzelluläre Bindungen herstellen kön-

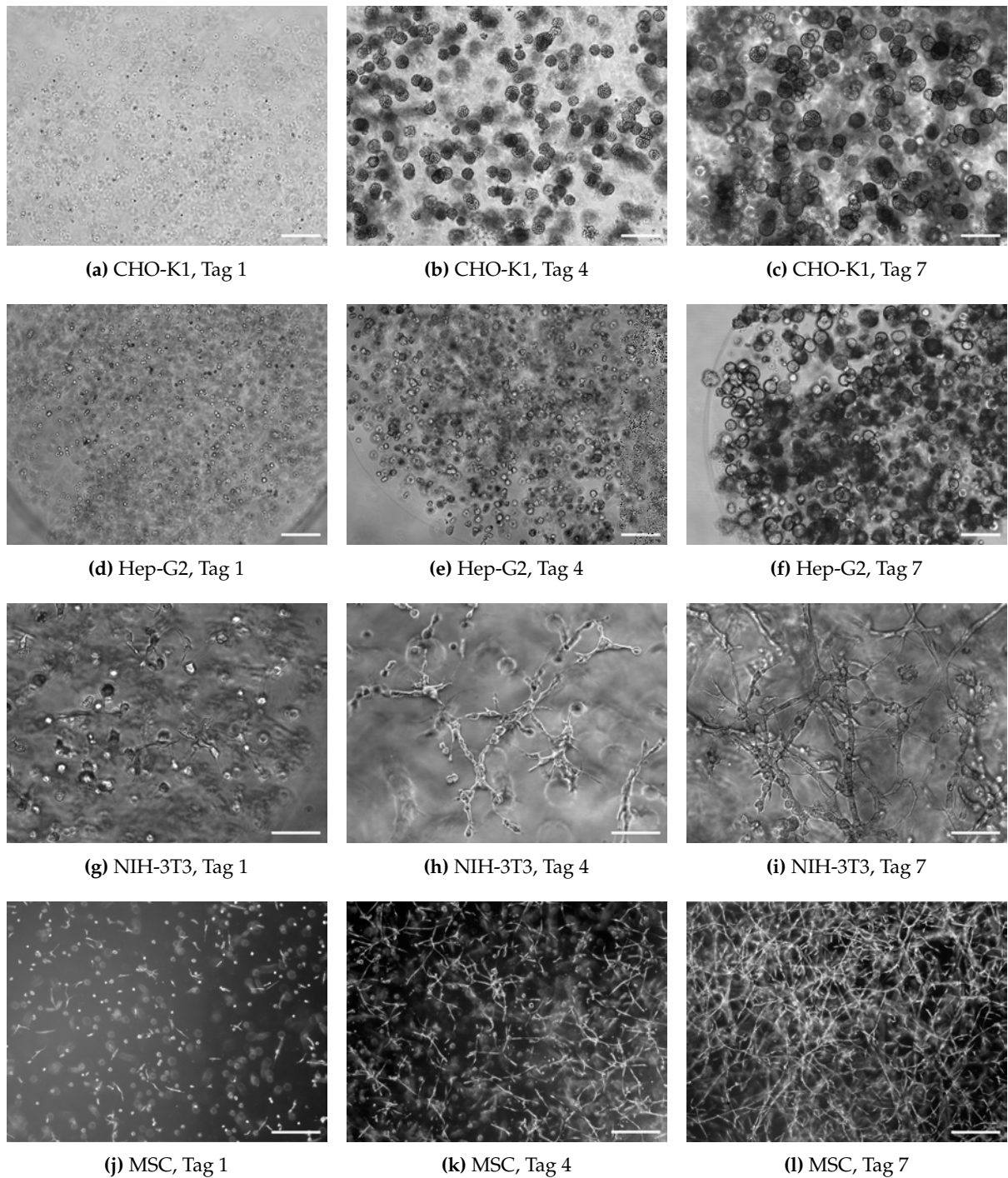


Abbildung 4.33 Mikroskopische Aufnahmen verschiedener Zelllinien und Primärzellen in soliden PF-Hydrogelkonstrukten an Tag 1, Tag 4 und Tag 7: **(a-c)** CHO-K1 (Suspensionszellen), Messbalken: 200 μm , **(d-f)** Hep-G2 (humane hepatocelluläre Karzinomzellen), Messbalken: 200 μm , **(g-i)** NIH-3T3 (murine embryonale Fibroblasten), Messbalken: 100 μm , **(j-l)** MSC (mesenchymale Stammzellen, isoliert aus humanem Fettgewebe), Messbalken: 500 μm .

nen. Diese Möglichkeit ist in einer 2D Kultur nicht gegeben, da sich die Zellen nur horizontal auf der Oberfläche ausbreiten können. In einem 3D System können die Zellen demnach auch ein dreidimensionales Zellnetzwerk ausbilden.

4.4.2 Kultivierung einer Fibroblastenzelllinie in einem PF-Hydrogel

Um das Wachstum näher zu analysieren, wurden PF-Hydrogelkonstrukte mit NIH-3T3-Zellen über 8 Tage kultiviert. Durchlichtaufnahmen der kompletten Konstrukte von 0, 4, 6 und 8 Tagen sind in Abbildung 4.34 gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die zunächst einzeln vorliegenden Zellen innerhalb weniger Tage vernetzen und ein dichtes dreidimensionales Netzwerk ausbilden. Das Hydrogelkonstrukt erscheint auf den mikroskopischen Aufnahmen in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer kontinuierlich dunkler, bis es an Tag 8 vollständig lichtundurchlässig ist. Während der Kultivierung wurden die Zellkerne in den Hydrogelkonstrukten für eine qualitative Auswertung nach 0, 4, 6 und 8 Tagen angefärbt. Der Farbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) interkaliert mit den Nukleinsäuren und ermöglicht die Detektion der Zellkerne mittels Fluoreszenzmikroskop. Die Aufnahmen sind in Abbildung 4.35 dargestellt und zeigen mit längerer Kultivierungsdauer eine intensivere Blaufärbung. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Zellen im Hydrogel nicht nur adhären, sondern auch proliferieren.

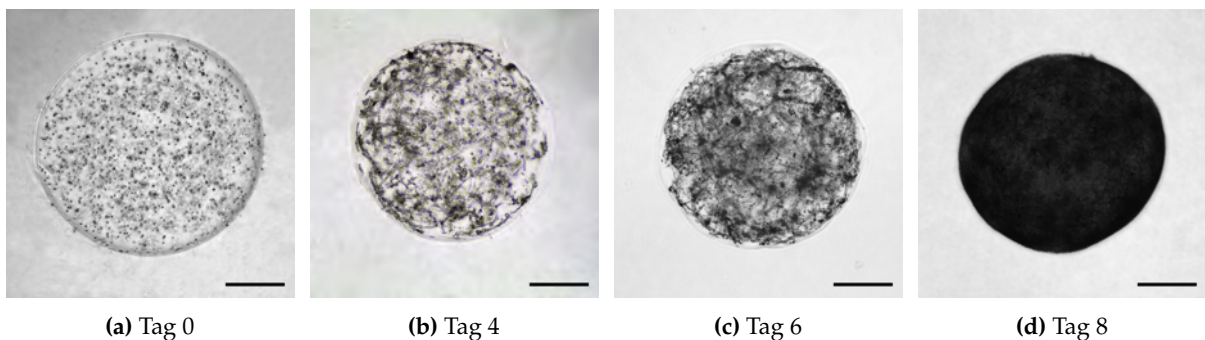


Abbildung 4.34 Mikroskopische Aufnahmen von NIH-3T3-Zellen im PF-Hydrogel nach 0, 4, 6 und 8 Tagen, Messbalken: 500 μm .

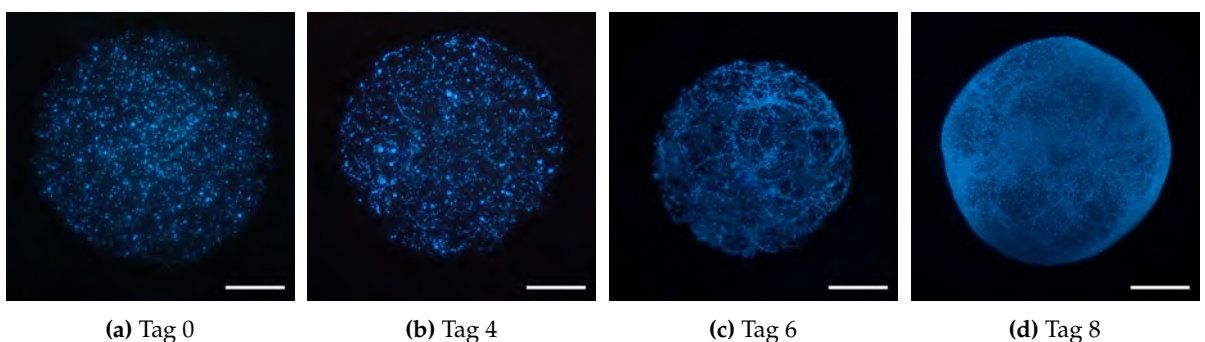


Abbildung 4.35 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von NIH-3T3-Zellen im PF-Hydrogel nach 0, 4, 6 und 8 Tagen, DAPI-Färbung, Messbalken: 500 μm .

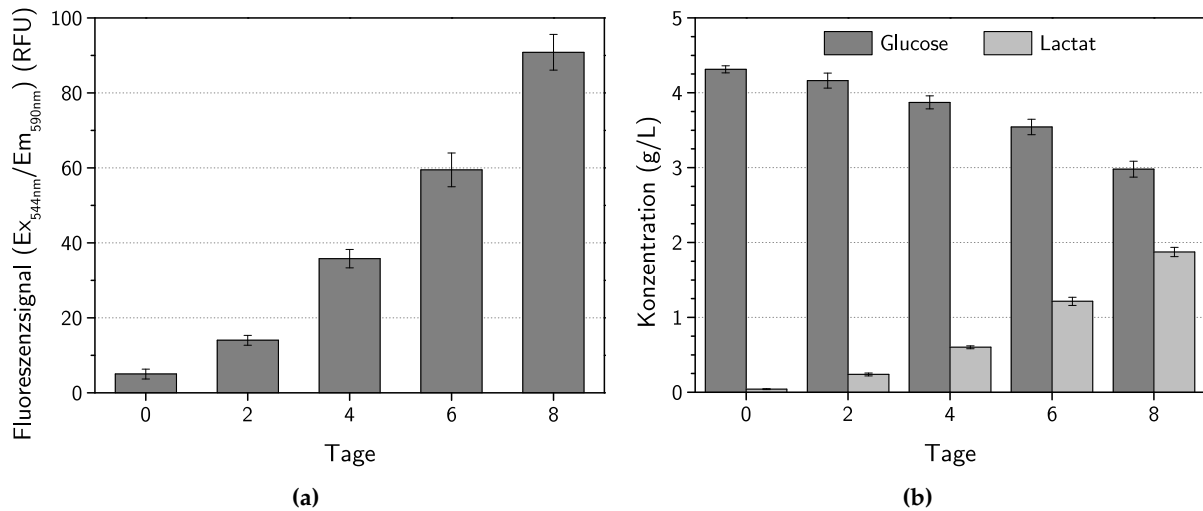


Abbildung 4.36 Kultivierung von NIH-3T3-Zellen in PF-Hydrogelkonstrukten: (a) Viabilitätsbestimmung mittels CTB-Test und (b) Glucose- und Lactatkonzentrationen nach unterschiedlichen Kultivierungstagen.

Um letztendlich auch die Proliferation nachzuweisen, wurde die Zellviabilität mithilfe des CellTiter-Blue[®] Cell Viability Test (CTB) bestimmt (Abschnitt B.6.7). Das Reagenz enthält den blauen Farbstoff Resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-on-10-oxid), der von lebenden Zellen zum pinkfarbenen, fluoreszierenden Resorufin (3-Oxo-3H-phenoxazin-10-ium-7-olat) reduziert wird. Das gemessene Fluoreszenzsignal ist direkt proportional zur Lebendzellzahl, so dass Aussagen über das Zellwachstum in einem Hydrogelkonstrukt getroffen werden können. Die Ergebnisse des CTB-Tests sind in Abbildung 4.36a gezeigt und bestätigen die Vermutung, dass die Zellen im Hydrogel proliferieren. Nach 8 Tagen ist das Fluoreszenzsignal im Vergleich zu Beginn der Kultivierung (Tag 0) 18 mal höher. Somit konnte gezeigt werden, dass die Zellen im Hydrogel wachsen. Die Verdopplungszeit der Zellen nimmt während der Kultivierung kontinuierlich von 31 Stunden auf 80 Stunden ab. Das bedeutet, je bewachsener das Hydrogelkonstrukt ist, desto länger benötigen die Zellen aufgrund der Kontaktinhibierung zur Zellteilung. In Abbildung 4.36b sind außerdem die Glucose- und Lactatkonzentrationen veranschaulicht. Dabei ist zu beobachten, dass die Zellen Glucose verstoffwechseln und entsprechend Lactat bilden. Anhand der Ergebnisse kann eine deutliche Stoffwechselaktivität der Zellen bzw. das Zellwachstum nachgewiesen werden.

4.4.3 Kultivierung mesenchymaler Stammzellen in Fibrinogen-basierten Hydrogelen

Da insbesondere die Kultivierung mesenchymaler Stammzellen in soliden dreidimensionalen Hydrogelkonstrukten von Bedeutung ist, wurde das Wachstum der Zellen in den zwei Fibrinogen-basierten PF- und FF-Hydrogelen untersucht (Abschnitt 3.2.2). Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse mit dem PF-Hydrogel dargelegt.

In Abbildung 4.37 sind Phasenkontrastaufnahmen einer Kultivierung mesenchymaler Stammzellen im PF-Hydrogel nach 0, 1, 4 und 7 Tagen dargestellt. Die Bilder in der ersten Spalte geben einen Überblick über das Hydrogelkonstrukt und zeigen das homogene Zellwachstum. Die zweite Spalte zeigt einen detaillierten Ausschnitt des Hydrogels, in dem einzelne Zellen und die interzellulären Verbindungen gut zu erkennen sind. Wie bereits in Abbildung 4.33 gezeigt, liegen die Zellen an Tag 0 rund vor und beginnen nach 24 h damit im Hydrogel zu adhären. Nach Tag 4 hat sich ein weitmaschiges Zellnetzwerk gebildet, das nach Tag 7 zu einem dichten Zellnetzwerk gewachsen ist. Aufgrund des dreidimensionalen Wachstums der Zellen im Hydrogel können nicht alle Ebenen fokussiert werden, so dass einige Bildteile unscharf dargestellt werden.

Um Auskunft über die Zellmorphologie bzw. das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen zu erhalten, wurden die Zellen mit Calcein-Acetoxyethyl (Calcein-AM) und Propidiumiodid gefärbt (Abschnitt B.6.5). Die mikroskopischen Aufnahmen sind in der dritten Spalte (Abb. 4.37) gezeigt. Der nicht fluoreszierende Ester Calcein-AM kann die Zellmembran passieren, und wird anschließend von metabolisch aktiven Zellen gespalten. Der entstehende Alkohol Calcein bildet mit Eisenionen des Zytoplasmas einen grün fluoreszierenden Chelatkomplex, der nicht membrangängig ist und lebende Zellen vollständig anfärbt. Propidiumiodid hingegen kann eine intakte Zellmembran nicht überwinden und gelangt dadurch nur in tote Zellen mit defekter Zellmembran (nekrotische Zellen). In der Zelle bindet der Farbstoff an die Nukleinsäuren der Zellkerne und färbt diese rot. In den Aufnahmen ist zu erkennen, dass die Zellen sowohl direkt nach der Immobilisierung in das Hydrogel, als auch während der gesamten Kultivierungsdauer von 7 Tagen eine hohe Zellviabilität aufweisen. Nur wenige rote Signale toter Zellen sind zu sehen. Einzelne Zellstrukturen können mittels Calcein-AM-Färbung jedoch nur unzureichend detektiert werden, da die Zellen vollständig gefärbt werden. Außerdem entstehen durch das dreidimensionale Zellnetzwerk viele Ebenen, wodurch bei der Fokussierung einer Ebene ein hohes Hintergrundsignal resultiert. Um das Zytoskelett erkennen zu können, wurde eine Phalloidin-DAPI-Färbung durchgeführt.

Phalloidin-DAPI-Färbung

Neben der Viabilität gibt auch die Zellmorphologie Aufschluss über den Zellzustand in einem 3D Hydrogelkonstrukt. Daher wurden MSC nach unterschiedlichen Kultivierungstagen mit Phalloidin und DAPI angefärbt und Bilder mittels Laser-Konfokalmikroskop aufgenommen. Fluoreszenz-gelabeltes Phalloidin bindet spezifisch an filamentöses Aktin (F-Aktin) und färbt die Strukturen des Zytoskeletts an, während DAPI die Detektion des Zellkerns ermöglicht. Dadurch können mittels Laser-Konfokalmikroskop Aufnahmen von Zellen mit hoher Tiefenschärfe und niedrigem Hintergrundsignal erzeugt werden (Abschnitt B.6.5). Die Aufnahmen sind in Abbildung 4.38 gezeigt. Bereits wenige Stunden nach der Verkapselung der Zellen in das Hydrogel liegen die Zellen nicht mehr vollkommen rund vor, sondern entwickeln bereits Zellausläufer (Abb. 4.38a). Mit diesen Zellausläufern binden die Zellen die Fibrinogenfragmen-

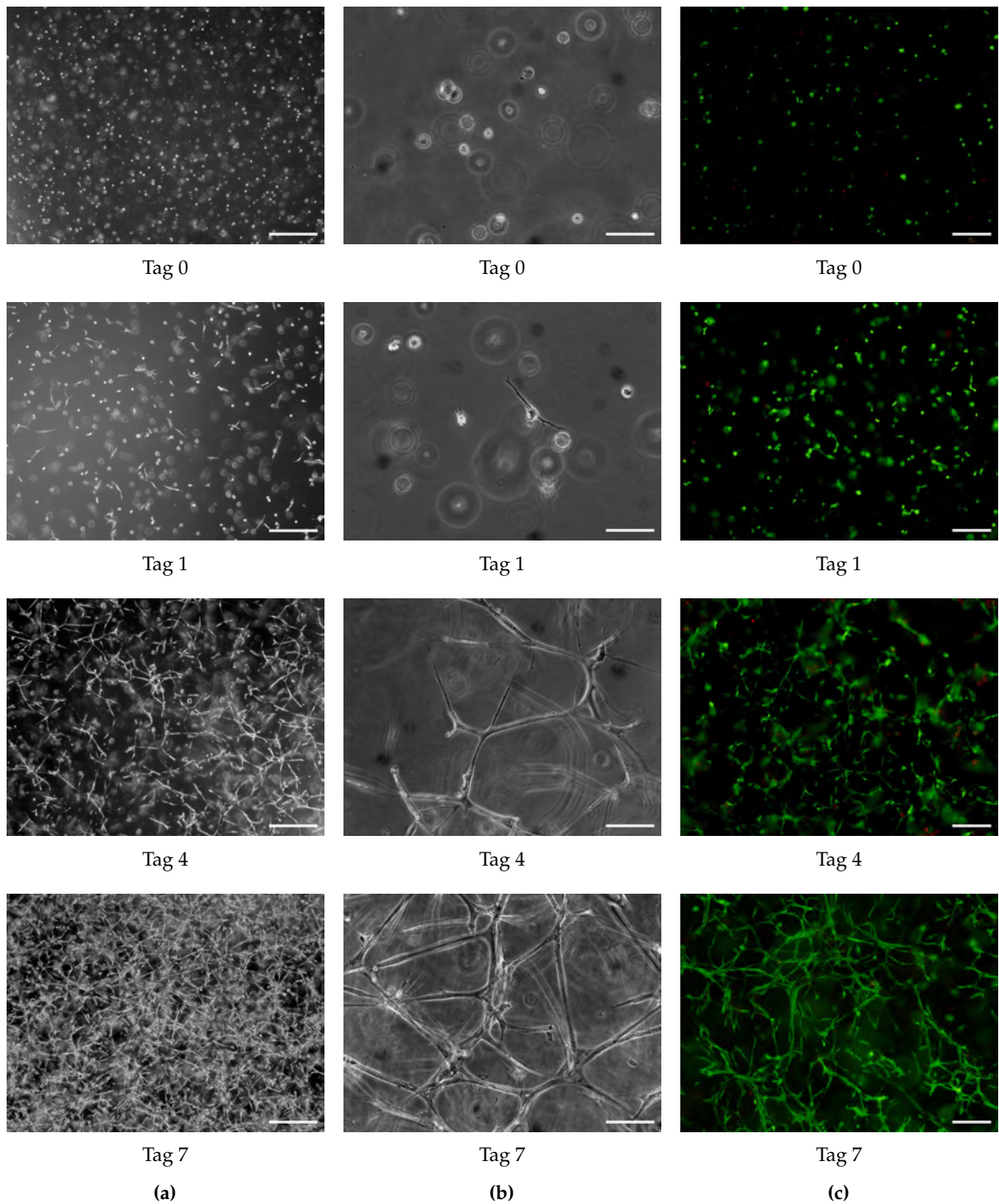


Abbildung 4.37 Mikroskopische Aufnahmen von MSC in soliden PF-Hydrogelkonstrukten an Tag 0, Tag 1, Tag 4 und Tag 7: **(a)** Phasenkontrastaufnahmen, Messbalken: 500 μm , **(b)** Phasenkontrastaufnahmen, Messbalken: 100 μm , **(c)** Fluoreszenzaufnahmen, viable Zellen wurden mit Calcein-AM (grün) und tote Zellen mit Propidiumiodid (rot) gefärbt, Messbalken: 200 μm .

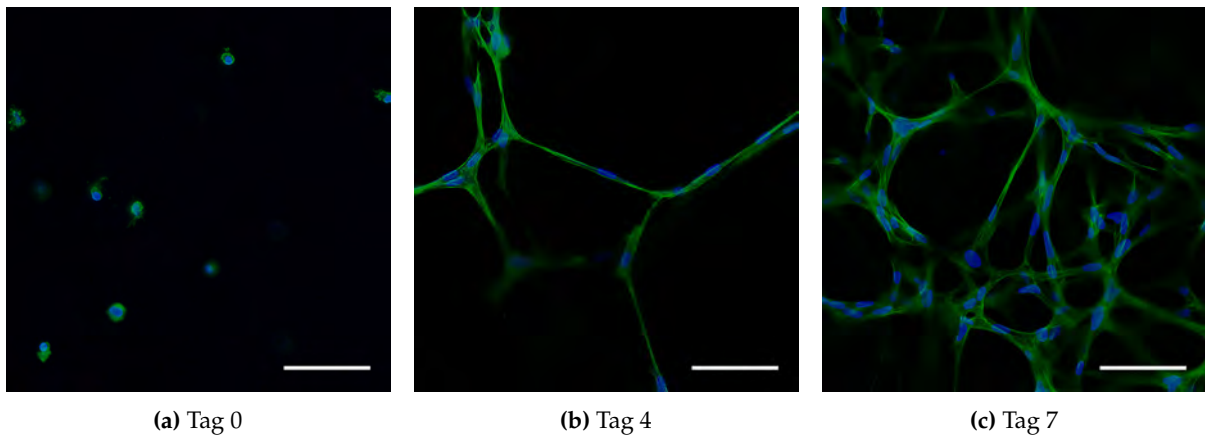


Abbildung 4.38 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MSC im PF-Hydrogel, Phalloidin-DAPI-Färbung, Messbalken: 100 μm .

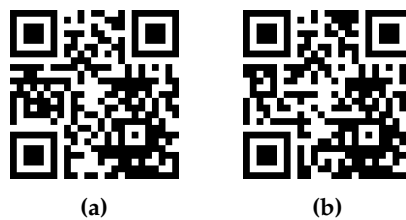


Abbildung 4.39 QR-Codes zu den Zeitrafferaufnahmen einer Kultivierung von MSC im PF-Hydrogel. Die Bilder wurden mittels LumaScope 600 und einem Zeitintervall von 120 s aufgenommen: (a) 4-fach Vergrößerung und (b) 10-fach Vergrößerung.

te oder nähern sich anderen Zellen an, um Zell-Zell-Kontakte auszubilden. Die Zellen weisen nun eine längliche Zellstruktur auf und bilden ein weitmaschiges, dreidimensionales Netzwerk (Abb. 4.38b). Die interzellulären Interaktionen fördern die Proliferation, so dass sich innerhalb von 7 Tagen ein dichtes Zellnetzwerk entwickelt (Abb. 4.38c). Die Zellen wachsen dabei in alle räumlichen Richtungen.

Um die Entwicklung des dreidimensionalen Zellnetzwerks nicht nur täglich, sondern kontinuierlich beobachten zu können, wurden Zeitrafferaufnahmen von MSC im PF-Hydrogel erstellt. Dazu wurden mittels LumaScope 600 (Etaluma Inc.) über 7 Tage alle 2 Minuten Bilder erstellt und als Zeitrafferaufnahme zusammengefügt. Über Abbildung 4.39 können die Videos in zwei unterschiedlichen Vergrößerungen abgerufen werden.

Proliferation der MSC in einem PF-Hydrogel

Analog zur Kultivierung der Fibroblastenzelllinie (Abschnitt 4.4.2) wurde ein CellTiter-Blue[®] Cell Viability Test mit MSC durchgeführt, um die Proliferation der Zellen im PF-Hydrogel zu untersuchen. Außerdem wurden die Glucose- und Lactatkonzentrationen regelmäßig während der Kultivierung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.40 dargestellt. Wie bei der vorangegangenen Kultivierung der Fibroblasten im PF-Hydrogel ist auch bei der Kultivierung von MSC ein deutlicher Anstieg des Fluoreszenzsignals innerhalb von 7 Kultivierungstagen zu

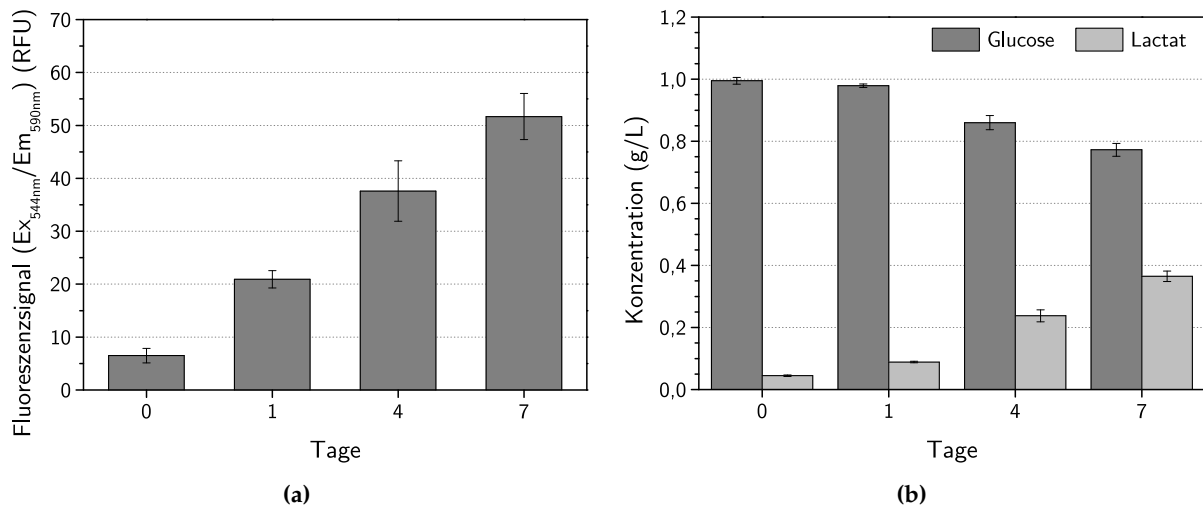


Abbildung 4.40 Kultivierung von MSC in PF-Hydrogelkonstrukten: (a) Viabilitätsbestimmung mittels CTB-Test und (b) Glucose- und Lactatkonzentrationen nach unterschiedlichen Kultivierungstagen.

beobachten. Nach 7 Tagen ist das Fluoreszenzsignal im Vergleich zu Beginn der Kultivierung (Tag 0) 8 mal höher und liegt somit insgesamt niedriger als die vergleichbare Kultivierung der Fibroblasten (Abb. 4.40a). Das niedrigere Signal kann auf die geringere Verdopplungszeit der MSC zurückzuführen sein und sagt nichts über die Qualität des Hydrogels für das Wachstum mesenchymaler Stammzellen aus. Die Abnahme der Glucosekonzentration und die Zunahme der Lactatkonzentration weisen ebenfalls auf eine Proliferation der MSC im Hydrogelkonstrukt hin und unterstützen das Ergebnis des CTB-Tests (Abb. 4.40b).

Quellverhalten von Hydrogelen

Die steigende Zellzahl führt dazu, dass die Zellen das gesamte Hydrogelkonstrukt über ihre interzellulären Kontakte und die Adhäsion an die Fibrinogenfragmente zusammenziehen. Dies ist auch im Video (Abb. 4.39a) zu beobachten. Um die Schrumpfung der Hydrogele quantifizieren zu können, wurde der Durchmesser der Konstrukte an unterschiedlichen Kultivierungstagen von jeweils drei Konstrukten bestimmt. Analog zu den Hydrogelen wurden Konstrukte ohne Zellen hergestellt, für mehrere Tage kultiviert und ebenfalls deren Durchmesser ermittelt. Mikroskopische Aufnahmen der Hydrogelkonstrukte mit Zellen an verschiedenen Tagen sind exemplarisch in Abbildung 4.41 dargestellt und zeigen, dass sich der Durchmesser sichtbar verkleinert. Die Durchmesser aller 3D Konstrukte nach 0, 1, 4 und 7 Tagen sind in Abbildung 4.42 dargestellt. Zu Beginn der Kultivierung (Tag 0) weisen die Hydrogelkonstrukte mit Zellen einen Durchmesser von 6,7 mm auf (Abb. 4.41a). Bis zu Tag 7 verringert sich der Durchmesser der Konstrukte um 55 %, so dass sie nur noch einen Durchmesser von 3,6 mm aufzeigen (Abb. 4.41d). Es wurde veranschaulicht, dass sich die 3D Hydrogelkonstrukte durch die steigende Proliferation und starke Vernetzung der Zellen deutlich komprimieren. Hydrogelkonstrukte, die ohne Zellen kultiviert wurden, nehmen hingegen Medium auf und quellen kontinuierlich. Nach 4 Tagen weisen die zellfreien Hydrogelkonstrukte einen Durchmesser

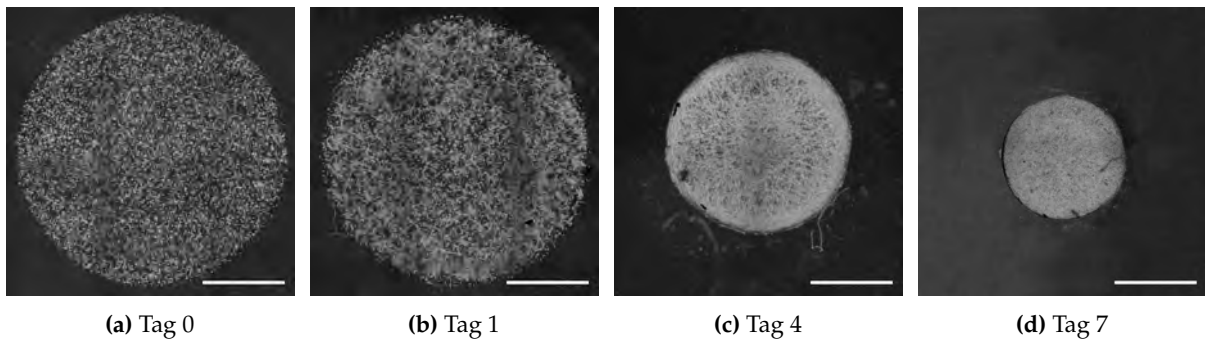


Abbildung 4.41 Mikroskopische Aufnahmen von PF-Hydrogelkonstrukten mit MSC nach 0, 1, 4 und 7 Kultivierungstagen. Der Durchmesser des Hydrogels reduziert sich innerhalb von 7 Tagen sichtbar, da die Zellen sich im Hydrogel miteinander vernetzen und das Hydrogel zusammenziehen, Messbalken: 2 mm.

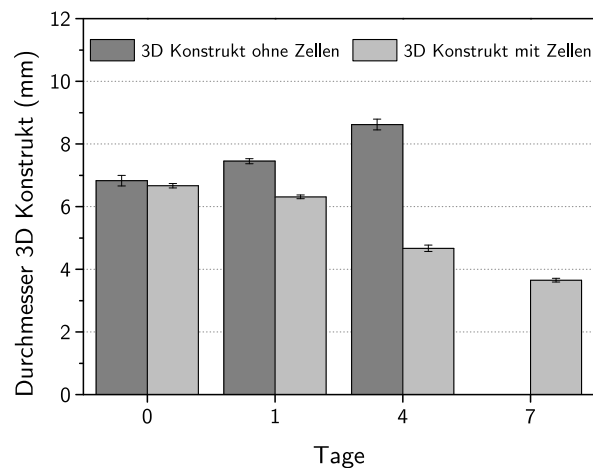


Abbildung 4.42 Durchmesser der Hydrogelkonstrukte mit und ohne immobilisierten Zellen über eine Kultivierungsdauer von 7 Tagen.

von durchschnittlich 8,6 mm auf. Dies entspricht einer Steigerung von knapp 30%. Durch die Einlagerung von Medium in dem Hydrogelkonstrukt gerät die Polymerstruktur stark unter Spannung, so dass sich das Hydrogel schließlich nach 7 Tagen im Medium auflöst.

Einfluss der PEGDA-Konzentration auf das Zellwachstum

Wie bereits in Abschnitt 4.2.3 beschrieben, hat die PEGDA-Konzentration einen entscheidenden Einfluss auf die Festigkeit der Hydrogele. Daher wurde untersucht, ob die Festigkeit auch einen Einfluss auf das Zellwachstum hat.

Dazu wurden solide PF-Hydrogelkonstrukte mit 1 Mio. Z/mL Hydrogel und 0%, 1% und 2% PEGDA hergestellt (Abschnitt B.4). Die Ergebnisse wurden nach 7 Tagen mit Phasenkontrastaufnahmen und einer Lebend-Tot-Färbung dokumentiert. Die mikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 4.43 dargestellt. Außerdem kann über Abbildung 4.43d ein Video abgerufen werden, das die verschiedenen Ebenen der Hydrogelkonstrukte mit 0%, 1% und 2% PEGDA nach drei Kultivierungstagen zeigt und die Unterschiede des Zellwachstums verdeutlicht.

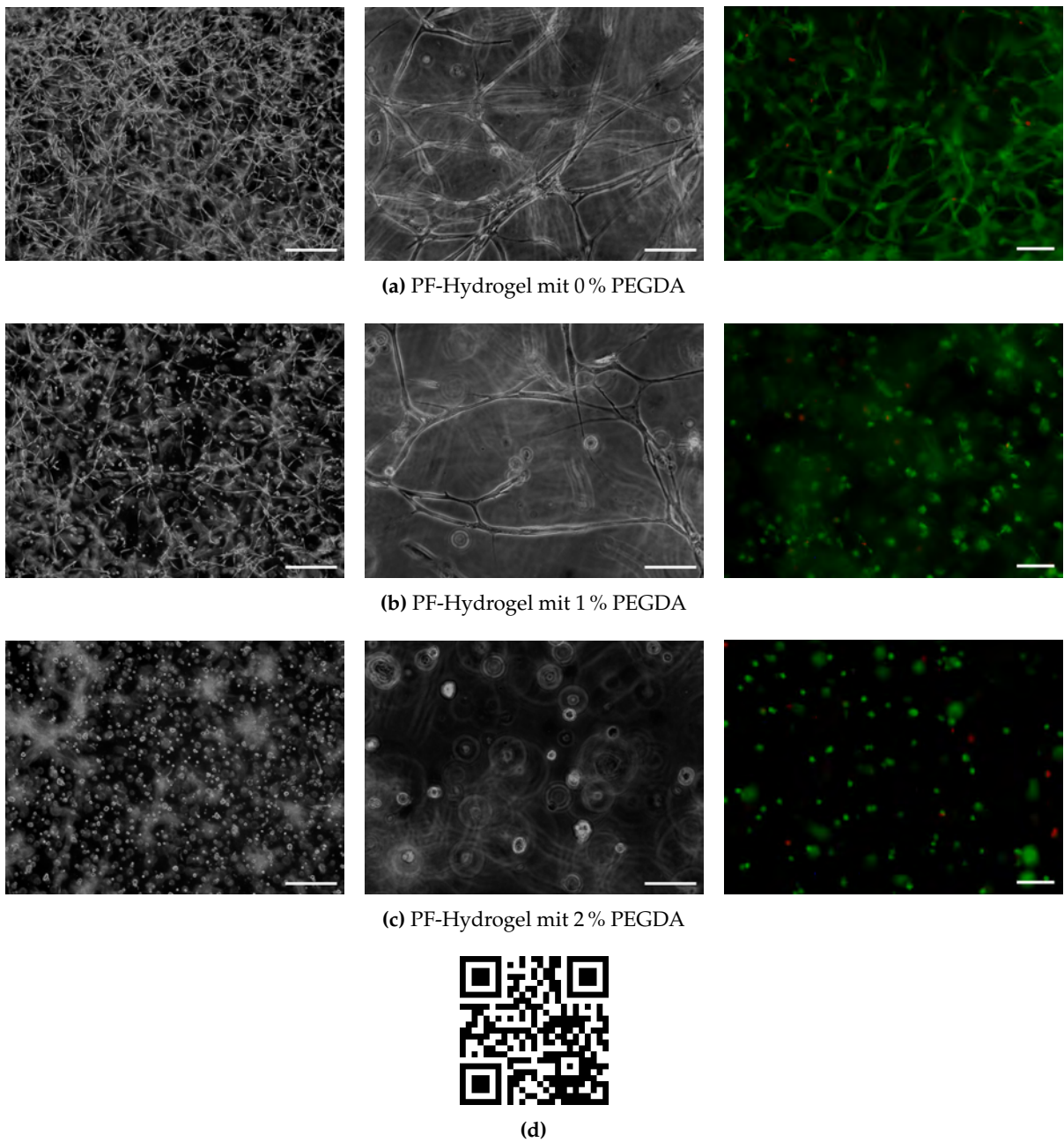


Abbildung 4.43 (a-c) Mikroskopische Aufnahmen von MSC in soliden PF-Hydrogelkonstrukten mit unterschiedlichen PEGDA-Konzentrationen nach 7 Tagen, Messbalken: 500 μm (links) und 100 μm (Mitte). Fluoreszenzaufnahmen, viable Zellen wurden mit Calcein-AM (grün) und tote Zellen mit Propidiumiodid (rot) gefärbt, Messbalken: 100 μm (rechts). (d) QR-Code zum Video, das die Ebenen der Hydrogelkonstrukte mit 0 %, 1 % und 2 % PEGDA nach 3 Kultivierungstagen zeigt.

Es ist zu erkennen, dass sich die MSC im Hydrogel mit 0 % PEGDA-Anteil am besten vernetzen (Abb. 4.43a). Die Zellen proliferieren in allen Ebenen des Hydrogelkonstruktes. Dabei bilden sie Zell-Zell-Verbindungen und ein dichtes, dreidimensionales Netzwerk aus. Im Hydrogel mit 1 % PEGDA wurden nach 7 Tagen sowohl adhärierte Zellen, als auch weniger gestreckte Zellen, die eine deutlich runde Zellmorphologie aufweisen, beobachtet (Abb. 4.43b). Bei der Kultivierung von MSC im Hydrogel mit 2 % PEGDA-Anteil liegen die Zellen nach 7 Tagen vollständig rund vor und zeigen keine Tendenz zur Zelladhäsion. Zellcluster, die auf eine Proliferation der verkapselten Zellen hindeuten würden, konnten in den Hydrogelkonstrukten nicht beobachtet werden. Allerdings adhärieren die Zellen auf der festen Oberfläche der Hydrogelkonstrukte, die in unmittelbarer Nähe zur Oberfläche verkapselt wurden und bilden teilweise Monolayer aus. Dennoch kann anhand der Lebend-Tot-Färbung gezeigt werden, dass die MSC in den Hydrogelkonstrukten mit allen drei PEGDA-Konzentrationen nach 7 Tagen eine hohe Viabilität aufweisen. Die Zellen im Hydrogel mit 2 % PEGDA können aufgrund der dichten Polymerstruktur zwar nicht adhärieren oder migrieren, allerdings werden sie mit ausreichend Nährstoffen versorgt. Die Viabilität der Zellen ist somit unabhängig von der Zelladhäsion im Hydrogel.

Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentration an PEGDA, die für die Festigkeit der Hydrogele verantwortlich ist, auch einen großen Einfluss auf das Zellwachstum hat. Die Zellen zeigen abhängig von der Umgebung, in der sie verkapselt werden, unterschiedliche morphologische Eigenschaften. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die MSC am besten im PF-Hydrogel mit 0 % PEGDA adhärieren und ein Zellnetzwerk ausbilden. Dennoch ist es möglich, dass die Zugabe von PEGDA bei anderen Zelllinien das Wachstum und die Adhäsion fördern.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, welchen Einfluss die PEGDA-Konzentration auf das Wachstum hat, wenn bereits Zellsphäroide statt einzelnen Zellen in das Hydrogel verkapselt werden. Zur Bildung der Zellsphäroide wurden 5000 Zellen pro Kavität in einer speziell beschichteten Mikrotiterplatte für 3 Tage kultiviert (Abschnitt B.5). Die Beschichtung verhindert die Adhäsion der Zellen an der Oberfläche des Kulturgefäßes, so dass sich innerhalb von 24 h ein runder Sphäroid bildet. Die Sphäroide wurden anschließend in 3D Hydrogelkonstrukten mit verschiedenen PEGDA-Konzentrationen (0 %, 0,5 %, 1 % und 2 %) immobilisiert und das Wachstum nach 7 Tagen ausgewertet. In Abbildung 4.44 sind exemplarisch mikroskopische Aufnahmen der Zellsphäroide in den Hydrogelen verschiedener PEGDA-Konzentrationen gezeigt. Anhand der Bilder wurden die durchschnittlichen Migrationsstrecken der Zellen bestimmt. Dazu wurden zehn Endpunkte migrierter Zellen und deren Abstand zum Mittelpunkt des Sphäroids gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.45a zusammengefasst. Über Abbildung 4.45b bzw. 4.45c können Zeitrafferaufnahmen einer Sphäroidbildung und der Zellmigration aus einem Sphäroid abgerufen werden.

Die mikroskopischen Aufnahmen der Sphäroide zeigen, dass alle Hydrogele ein Auswachsen der Sphäroidzellen aus dem Hydrogel zulassen. Zellen, die im Hydrogel mit 0 % PEGDA kultiviert wurden, zeigen nur eine geringe Tendenz in das Hydrogel zu migrieren. Die Zellen

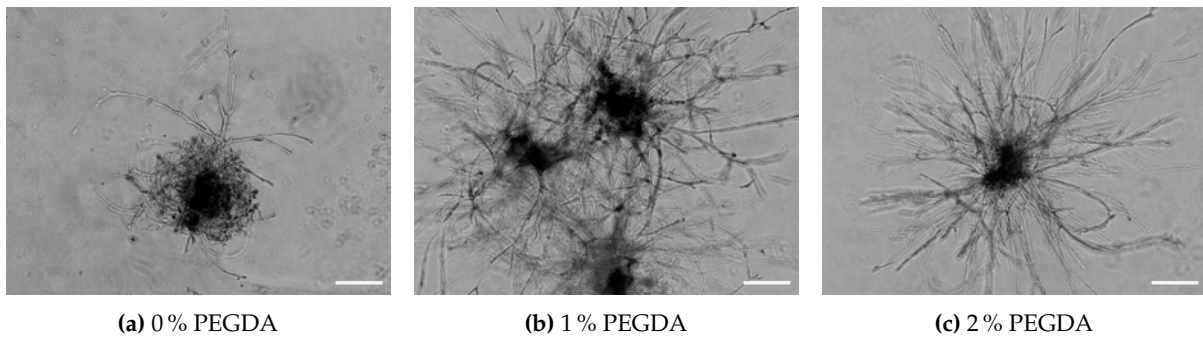


Abbildung 4.44 Mikroskopische Aufnahmen immobilisierter Sphäroide im PF-Hydrogel mit unterschiedlichen PEGDA-Konzentrationen nach 7 Tagen, Messbalken: 200 μm .

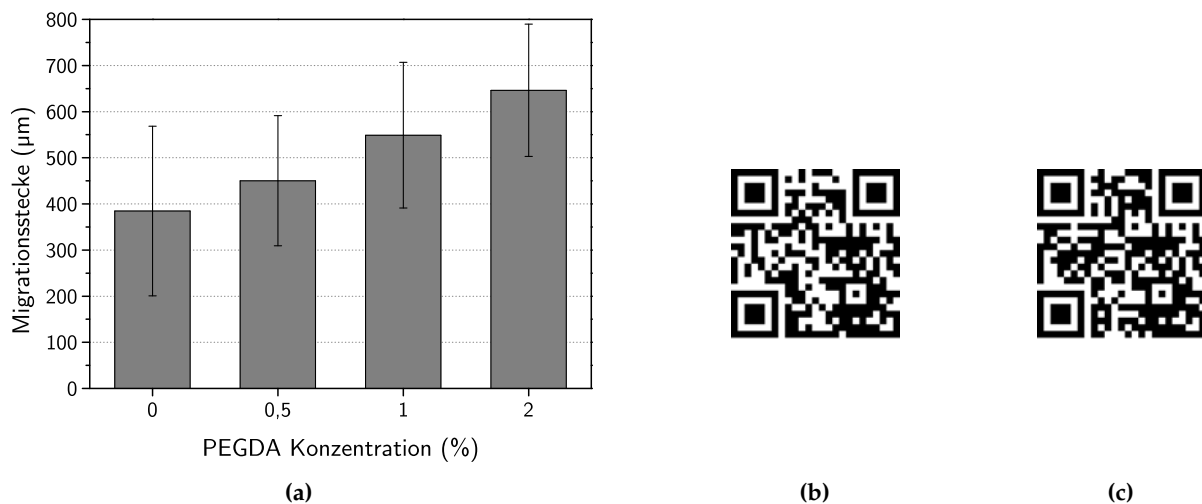


Abbildung 4.45 (a) Durchschnittliche Migrationsstrecke der Zellen im PF-Hydrogel mit verschiedenen PEGDA-Konzentrationen, (b) QR-Code zur Zeitrafferaufnahme einer Sphäroidbildung über 24 h und (c) QR-Code zur Zeitrafferaufnahme einer Migration von MSC aus einem Sphäroid im PF-Hydrogel mit 1 % PEGDA über 4 Tage. Die Bilder wurden mittels LumaScope 600, 10-fach Objektiv und einem Zeitintervall von 120 s aufgenommen.

bilden bevorzugt ein dichtes Zellnetzwerk um den immobilisierten Sphäroid (Abb. 4.44a). Die mittlere Migrationsstrecke wurde mit 384 μm bestimmt. Im Hydrogel mit 0,5 % PEGDA weisen die Zellen bereits ein größeres Bestreben auf, in das umgebende Hydrogel zu migrieren. Durchschnittlich entfernen sich die Zellen 450 μm vom Sphäroidmittelpunkt und weisen ebenfalls netzartige Zellstrukturen in der Nähe der Sphäroide auf. Ähnliches Verhalten ist bei Zellen in dem Hydrogel mit 1 % PEGDA zu beobachten. In Abbildung 4.44b sind beispielhaft drei Sphäroide gezeigt, die in unmittelbarer Nähe zueinander immobilisiert wurden. Es ist zu erkennen, dass die Zellverbände sich untereinander vernetzen und interzelluläre Kontakte ausbilden. Dennoch weisen die Zellen vermehrt eine Migration in das Hydrogel auf. Nach 7 Tagen wurde eine mittlere Migrationsstrecke von 549 μm gemessen. MSC, die im Hydrogel mit 2 % PEGDA immobilisiert wurden, weisen mit einer Migrationsstrecke von durchschnittlich 640 μm das höchste Bestreben auf, den Sphäroid zu verlassen. Die Zellen bilden kein Zellnetzwerk in der Nähe der Sphäroide aus (Abb. 4.44c). Es konnte dargestellt werden, dass die Bereitschaft der Zellen aus dem Sphäroid in das Hydrogel zu migrieren mit steigendem PEGDA-Anteil deutlich zunimmt.

Die Ergebnisse der Experimente haben gezeigt, dass einzelne Zellen in sehr festen Hydrogelen keine Migration zeigen (Abb. 4.43c). Werden Zellen allerdings als bestehendes Zellaggregat in das Hydrogel eingebracht, weisen die Zellen ein anderes Migrationsverhalten auf. Dies kann möglicherweise auf die Kontaktinhibierung der Zellen in den Sphäroiden und daraus resultierenden unterschiedlich aktiven Signalkaskaden zurückgeführt werden. Je höher der PEGDA-Anteil im Hydrogel bzw. je fester das Hydrogel ist, desto weniger bilden die Zellen ein dreidimensionales Zellnetzwerk aus und desto größer ist ihr Bestreben aus dem Sphäroid in das Hydrogel zu migrieren. Sehr feste Hydrogele weisen tunnelartige Strukturen auf, in denen die Zellen wachsen. Weichere Hydrogele hingegen stellen weitmaschigere Strukturen zur Verfügung, in denen die Zellen ein dreidimensionales Zellnetzwerk aufbauen können.

Bestimmung der Sauerstoffkonzentration in Hydrogelen

Für die Zellkultivierung in soliden 3D Hydrogelsystemen ist es von großer Bedeutung die Sauerstoffkonzentration im Inneren eines Hydrogelkonstruktes zu überwachen, um festzustellen, ob ein effektiver Stofftransport gewährleistet werden kann. Sauerstoff-Mikrosensoren (PreSens GmbH), die auf Quarzglasfasern basieren, können beispielsweise direkt in das Hydrogel eingebettet werden, um den Sauerstoffgehalt online zu messen [87]. Ein Nachteil dieser Messmethode ist allerdings, dass mit einer Sonde jeweils nur eine Position im Hydrogel vermessen werden kann. Der Sauerstoffgehalt eines dreidimensionalen Konstruktes kann mit dieser Methode folglich nicht in mehreren Ebenen bestimmt werden.

Daher wurde die Messung des Sauerstoffgehalts mit einer neuartigen Methode durchgeführt, bei der die Sauerstoffkonzentrationen über phosphoreszierende Polystyrolpartikel (CPOx) mit O₂-sensitiven Fluorophoren gemessen wird (Colibri Photonics GmbH) [88]. Die Partikel sind mit 10 µm bis 50 µm sehr klein und können problemlos während des Herstellungsprozesses von Hydrogelkonstrukten in das Hydrogel eingebettet werden. Dazu wurden die CPOx-Partikel mit flüssigem Hydrogel und MSC suspendiert. Aus der Suspension wurden solide 3D Hydrogelkonstrukte mit 12 500 Zellen pro Konstrukt hergestellt. Diese wurden für 4 Tage in 1 mL Medium kultiviert (Abb. 4.46a). Analog zu den Hydrogelkonstrukten wurden Zellsphäroide mit CPOx-Partikeln und einer Startzellzahl von 12 500 Zellen hergestellt (Abschnitt B.5). Nach 4 Tagen Kultivierung wiesen die Sphäroide einen mittleren Durchmesser von 440 µm auf. Durch die Vielzahl immobilisierter Sauerstoffsonden konnte der Sauerstoffgehalt an unterschiedlichen Positionen der 3D Zellkultursysteme bestimmt werden. Die Erfassung sauerstoffabhängiger Lichtsignale der Polystyrolpartikel wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt, das zusätzlich mit einem Photomultiplier (OPAL System) ausgestattet wurde. Für die Messung wurden pro Position jeweils vier CPOx-Partikel mit mindestens 25 Messpunkten vermessen und ausgewertet.

In Abbildung 4.46b werden die Sauerstoffkonzentrationen an verschiedenen Positionen der Hydrogelkonstrukte und in den Sphäroiden miteinander verglichen. Die Messungen wurden im Bereich der Hydrogeloberfläche, am Boden und in der Mitte des Hydrogels durchgeführt. Der

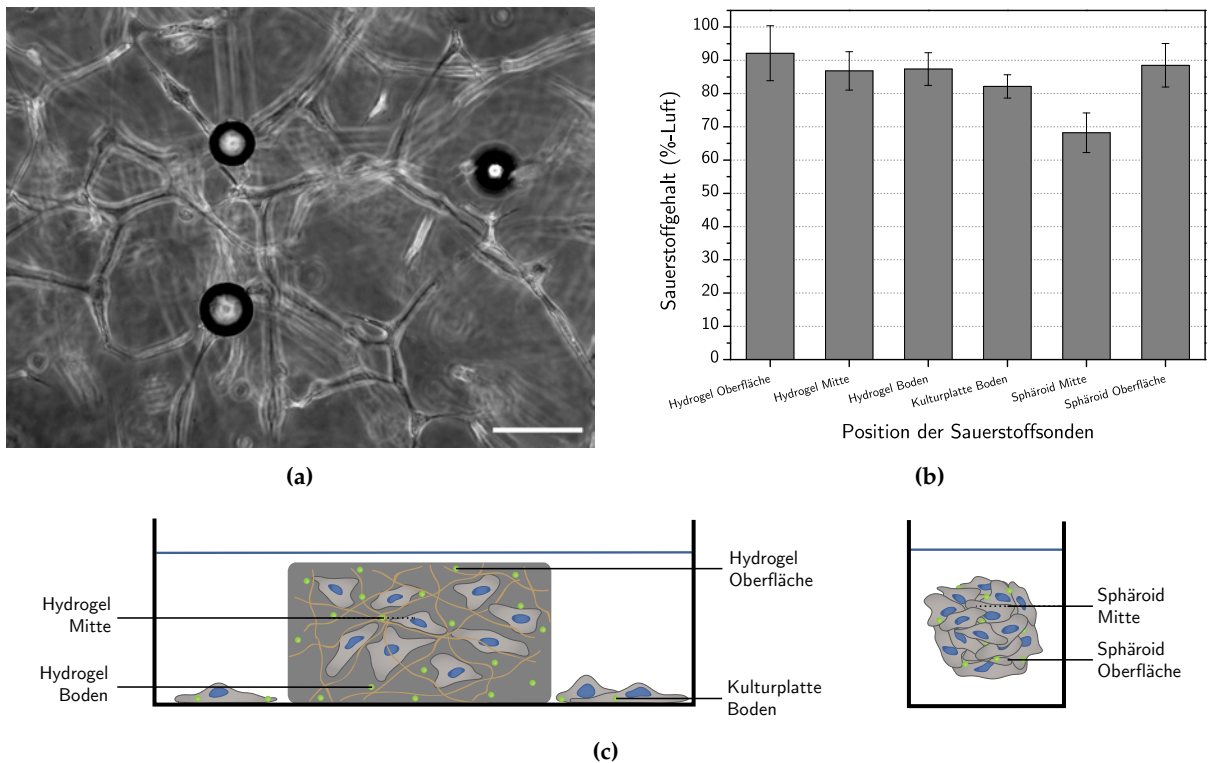


Abbildung 4.46 (a) Mikroskopische Aufnahme immobilisierter Sauerstoffsonden (CPOx-Partikel) im PF-Hydrogel nach 4 Kultivierungstagen, Messbalken: 100 μm . (b) Prozentualer Sauerstoffgehalt der Luft an unterschiedlichen Positionen der 3D Zellkultursysteme: Hydrogelkonstrukte (1 mL Medium) und Sphäroide (200 μL Medium). (c) Schematische Darstellung der Positionen immobilisierter Sauerstoffsonden in den 3D Zellkultursystemen.

Abstand zwischen der Oberfläche und der Mitte des Hydrogels betrug etwa 450 μm . Außerdem wurde die Sauerstoffkonzentration am Boden der Kulturplatte sowie an der Sphäroidoberfläche und in der Sphäroidmitte gemessen (Abb. 4.46c).

Der höchste Sauerstoffgehalt (prozentualer Anteil der Luft) wurde in der Hydrogeloberfläche mit 92 % bestimmt. In der Mitte und am Boden des Hydrogels beträgt der Anteil noch 87 %, auf dem Boden der Kavität 82 %. Es ist erkennbar, dass sich der Sauerstoffanteil aufgrund von Diffusion mit der Tiefe der Kavität verringert. Allerdings ist auch zu beobachten, dass die Sauerstoffkonzentration in der Mitte des Hydrogelkonstruktes trotz des Zellnetzwerks nicht erheblich niedriger ist. Das Hydrogel ist demnach großporig genug, um die Zellen ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen. In der Sphäroidmitte wurde hingegen nur ein Sauerstoffanteil von 68 % gemessen. Zellsphäroide bilden ein dichtes Zellaggregat, das unterschiedliche Strukturen aufweisen kann. Sie bestehen aus einer inneren Schicht ruhender Zellen und einer äußeren Schicht proliferierender Zellen. Ab einem Durchmesser von 500 μm kann es zur Bildung eines nekrotischer Kerns kommen, der von der vitalen Außenzone umgeben ist [18]. Da viable Zellen gleichermaßen Sauerstoff verbrauchen, bildet sich aufgrund von Diffusionslimitierung ein Sauerstoffgradient in den Späroiden aus. Der Sauerstoffanteil am Rand der Zellsphäroide lag mit 88 % höher als in der Sphäroidmitte, so dass die Zellen in dieser Ebene noch ausreichend mit Nährstoffen versorgt wurden. Im Vergleich zur Hydrogeloberfläche (92 %) liegt der Sauerstoffgehalt am Rand der Sphäroide jedoch niedriger. Es konnte gezeigt werden, dass in den

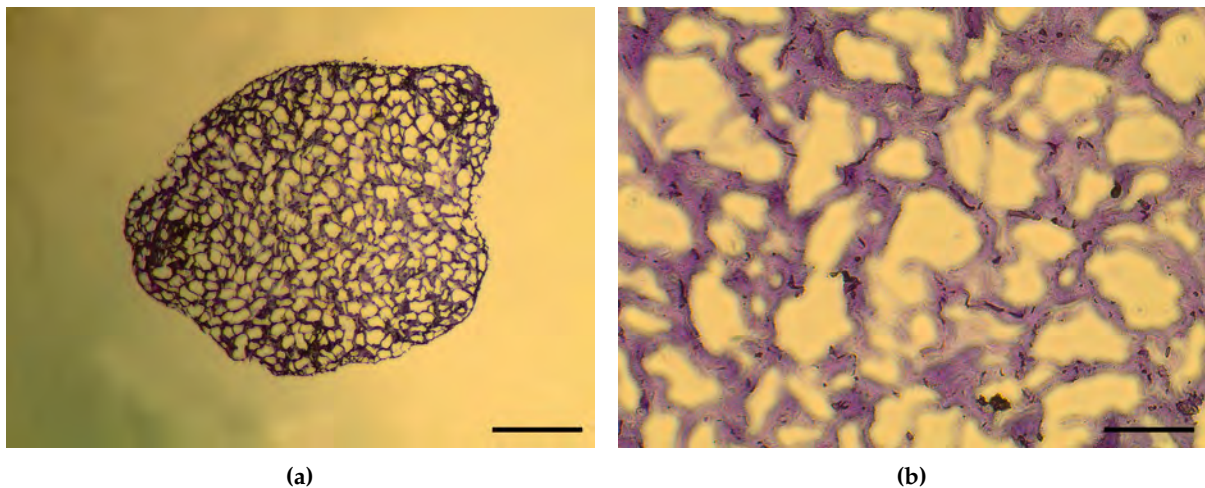


Abbildung 4.47 (a) Mikrotomschnitt eines PF-Hydrogelkonstruktes mit MSC nach 7 Tagen, 50 µm Schichtdicke, Kristallviolett-Färbung, Messbalken: 500 µm, (b) Detailaufnahme des Mikrotomschnittes, Messbalken: 100 µm.

3D Hydrogelkonstrukten nach 4 Tagen keine Sauerstofflimitierung vorliegt, während deutlich kleinere Sphäroide bereits einen geringeren Sauerstoffgehalt aufweisen. Demnach sollten die Zellen am Rand und in der Mitte der Konstrukte gleichermaßen ein Zellnetzwerk aufbauen.

Um das homogene Zellwachstum zu verifizieren, wurden von den Hydrogelkonstrukten nach 7 Tagen histologische Schnitte mit einer Schichtdicke von 50 µm angefertigt [89]. Die Zellen wurden anschließend mit einer Kristallviolett-Lösung angefärbt. In Abbildung 4.47 ist exemplarisch ein Querschnitt eines Hydrogelkonstruktes nach 7 Kultivierungstagen gezeigt. Es zeigt, dass sich im gesamten Hydrogel ein homogenes Zellnetzwerk ausgebildet hat. Dabei ist visuell kein Unterschied zwischen den am Rand und den im Inneren wachsenden Zellen zu erkennen.

Differenzierung von MSC in einem PF-Hydrogel

Mesenchymale Stammzellen erscheinen im Bereich des Tissue Engineerings aufgrund ihrer Eigenschaften vielversprechend. Sie haben nicht nur ein großes Differenzierungspotenzial und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, sondern produzieren auch verschiedene Zytokine und können das Überleben von beschädigten Zellen fördern. Laut International Society for Cellular Therapy (ISTC) müssen isolierte MSC Mindestkriterien erfüllen und sich *in vitro* zu Adipozyten (Fettzellen), Chondrozyten (Knorpelzellen) und Osteozyten (Knochenzellen) differenzieren. Nachdem bereits erfolgreich gezeigt werden konnte, dass MSC in den Hydrogelen proliferieren, wurden Differenzierungsexperimente in dreidimensionalen Hydrogelkonstrukten durchgeführt. Zunächst wurden MSC für 4 Tage in Hydrogelkonstrukten kultiviert. Damit wurde gewährleistet, dass die Zellen im Hydrogel adhärieren und sich ausreichend miteinander vernetzen. Die Zelldifferenzierung der MSC in Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten wurde durch die Kultivierung der Hydrogele in entsprechenden Differenzierungsmedien über 21 Tage erreicht (Abschnitt B.4.1). Anschließend wurden von den Hydrogelkonstrukten mit

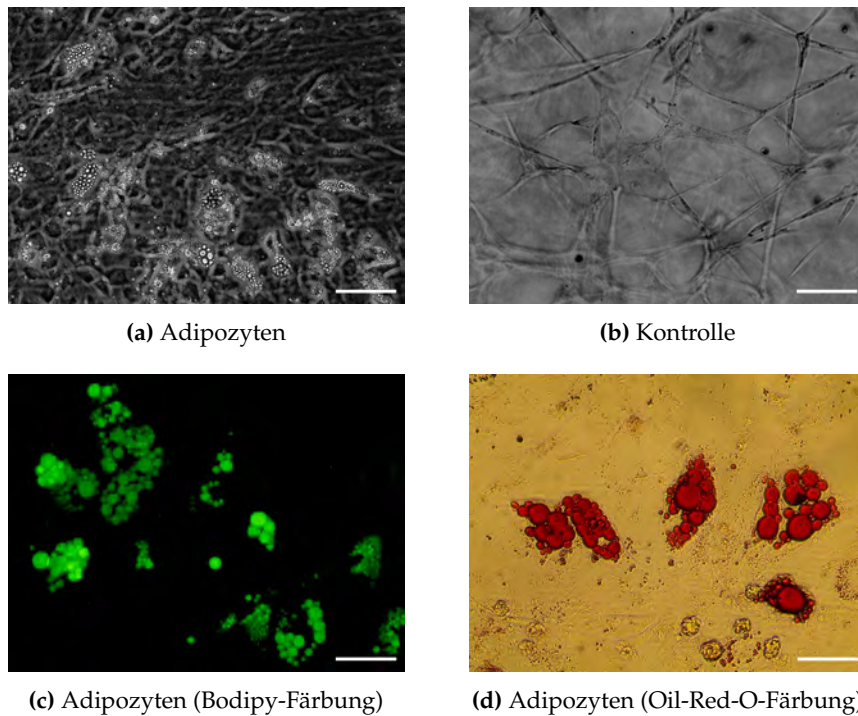
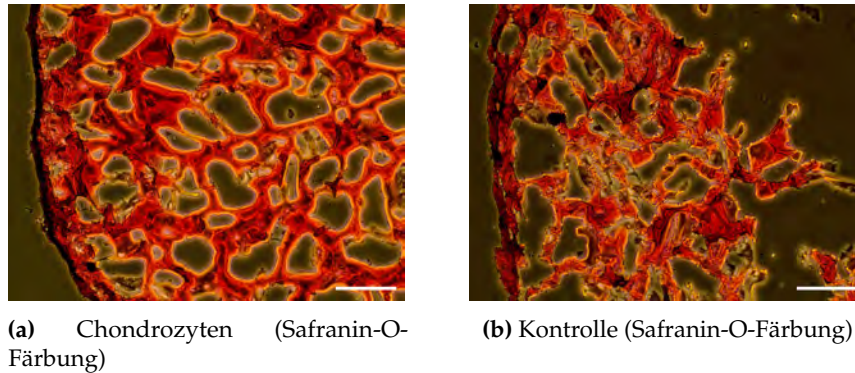


Abbildung 4.48 Mikroskopische Aufnahmen der Adipozyten (Fettzellen): (a) Durchlichtaufnahme der differenzierten Zellen und (b) undifferenzierten Kontrolle, Messbalken: 100 μm . (c) Differenzierte Zellen (Bodipy-Färbung) und (d) differenzierte Zellen (Oil-Red-O-Färbung), Messbalken: 50 μm .

einem Gefriermikrotom histologische Schnitte mit einer Schichtdicke von 20 μm angefertigt und für den Nachweis der Differenzierung entsprechend gefärbt. Als Kontrolle dienten Mikrotomschnitte von undifferenzierten Hydrogelkonstrukten, die ebenfalls spezifisch gefärbt wurden. Die mikroskopischen Aufnahmen der differenzierten MSC sind in Abbildung 4.48, 4.49 und 4.50 gezeigt.

Die Zellstruktur der in adipogenem Medium kultivierten MSC veränderte sich gegenüber den undifferenzierten Zellen deutlich. Bei den differenzierten MSC lösten sich die Zell-Zell-Verbindungen und die Bindung der Zellen an die Hydrogel-Polymermatrix war weniger stark ausgeprägt. Die Zellen erschienen runder und enthielten viele intrazelluläre Lipidvesikel (Abb. 4.48a). Bei der undifferenzierten Kontrolle blieb das kompakte Zellnetzwerk hingegen bestehen und es konnten keine Lipidvesikel beobachtet werden (Abb. 4.48b). Aufgrund der zerfallenen Hydrogelstruktur konnten von den Adipozyten keine klassischen histologischen Schnitte angefertigt werden. Dennoch konnte die Bildung der Adipozyten anhand von Hydrogelfragmenten nachgewiesen werden. Die Triglyceride in den Lipidvesikeln konnten sowohl mit der Bodipy-Färbung (Abb. 4.48c) als auch mit der Oil-Red-O-Färbung (Abb. 4.48d) spezifisch nachgewiesen werden.

Bei der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Chondrozyten wurde durch einen Farbwechsel des Mediums eine Änderung des pH-Wertes in den sauren Bereich beobachtet. Da eine sehr hohe Lactatkonzentration bei einem Mediumwechsel nach 4 Tagen auszuschließen ist, muss die pH-Wert-Änderung durch die Zellen selbst verursacht worden sein. Der



(a) Chondrozyten (Safranin-O-Färbung)

(b) Kontrolle (Safranin-O-Färbung)

Abbildung 4.49 Mikroskopische Aufnahmen der Mikrotomschnitte der Chondrozyten (Knorpelzellen): (a) Differenzierte Zellen und (b) undifferenzierte Kontrolle (Safranin-O-Färbung), Messbalken: 100 μm .

Hauptbestandteil des Interzellularbereichs bei Knorpelgewebe besteht neben Wasser aus sauren Proteoglykanen, die für die Änderung des pH-Wertes verantwortlich gemacht werden können. Das differenzierte Hydrogelkonstrukt und die Kontrolle wiesen nach 21 Tagen eine feste, knorpelähnliche Struktur auf. Die angefertigten Mikrotomschnitte wurden jeweils mit Safranin-O angefärbt. Safranin-O ist ein Farbstoff, der saure Proteoglykane des Knorpelgewebes bindet und diese somit detektiert werden können. Allerdings konnte die Differenzierung mit der Safranin-O-Färbung nicht nachgewiesen werden, da die Kontrolle das gleiche Farbbild zeigt. Die Mikrotomschnitte sind in Abbildung 4.49 dargestellt. Eine mögliche Erklärung ist die spontane Differenzierung zu Chondrozyten.

Für den Nachweis der osteogenen Differenzierung wurden die Mikrotomschnitte der Hydrogelkonstrukte nach von Kossa und mit Alizarinrot gefärbt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.50 gezeigt. Osteozyten zeichnen sich durch einen hohen Anteil an Calciumphosphaten aus, die mit den Färbungen nachgewiesen werden können. Dabei reagieren die Silberionen der von Kossa-Lösung mit den Phosphatsalzen und färben den Interzellularraum dunkel an. Bei den differenzierten MSC ist eine deutliche Dunkelfärbung zu sehen, die im Vergleich zur undifferenzierten Kontrolle nicht zu beobachten ist. Alizarinrot färbt hingegen eingelagertes Calcium an. Auch bei dieser Färbung sind Unterschiede zwischen den differenzierten Zellen und der Kontrolle zu beobachten. Die differenzierten Zellen zeigen neben einer starken roten Färbung ECM-Ablagerungen, so genannte *bone nodules*. Diese sind als runde Objekte deutlich zu erkennen. *Bone nodules* werden von den Osteozyten in den extrazellulären Raum abgegeben, wo sie sich ansammeln. Im Vergleich dazu weist die undifferenzierte Kontrolle keine Rotfärbung sowie *bone nodules* auf.

Durch die Experimente konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung von MSC in dreidimensionalen Systemen möglich ist. Dabei konnte das deutlichste Ergebnis bei der Differenzierung der MSC zu Osteozyten erzielt werden. Auch die Differenzierung zu Adipozyten konnte erfolgreich nachgewiesen werden. Hier bleibt aufgrund der runden Zellmorphologie der Adipozyten und verminderten interzellulären Verbindungen das Hydrogelkonstrukt jedoch nicht erhalten.

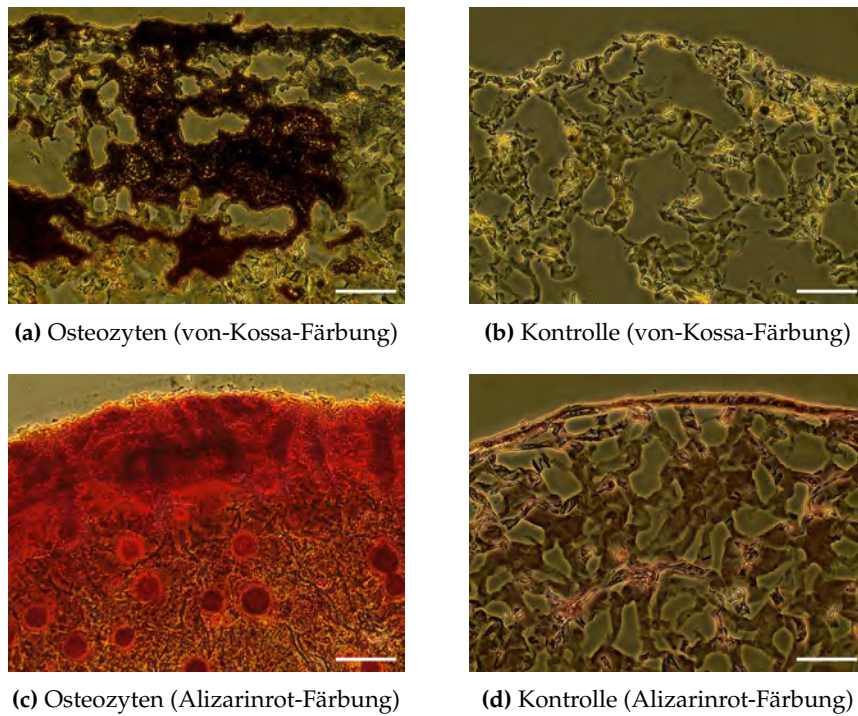


Abbildung 4.50 Mikroskopische Aufnahmen der Mikrotomschnitte der Osteozyten (Knochenzellen): (a) Differenzierte Zellen und (b) undifferenzierte Kontrolle (von-Kossa-Färbung) sowie (c) differenzierte Zellen mit *bone nodules* und (d) undifferenzierte Kontrolle (Alizarinrot-Färbung), Messbalken: 100 μm .

Proliferation der MSC im FF-Hydrogel

Die bisher gezeigten Experimente wurden alle mit PF-Hydrogel durchgeführt. In diesem Abschnitt soll gezeigt werden, dass die Kultivierung von Zellen ebenfalls im FF-Hydrogel möglich ist. Dazu wurden solide 3D FF-Hydrogelkonstrukte mit verkapselten MSC (1 Mio. Z/mL) mit einem Volumen von 50 μL hergestellt (Abschnitt B.4). Durch Temperaturänderung auf 37 $^{\circ}\text{C}$ kann das Hydrogel zwar reversibel vernetzt werden, allerdings lösen sich die Hydrogelkonstrukte im Medium innerhalb von 48 h auf. Um dennoch die Stabilität über 7 Tage zu gewährleisten, wurden die FF-Hydrogele analog zu den PF-Hydrogelkonstrukten für 2 min mit UV-Licht irreversibel vernetzt. Dabei wurde beobachtet, dass das FF-Hydrogel bei 37 $^{\circ}\text{C}$ bzw. nach der Polymerisation weiß-milchig vorliegt, so dass keine mikroskopischen Durchlichtaufnahmen der verkapselten Zellen gemacht werden können.

Um die Zellstrukturen und das Verhältnis von lebenden und toten Zellen bestimmen zu können, wurden die Hydrogelkonstrukte nach 1, 4 und 7 Tagen mit Calcein-AM und Propidiumiodid gefärbt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 4.51 dargestellt. Analog zu der Kultivierung von MSC im PF-Hydrogel (Abb. 4.37) bilden die Zellen im FF-Hydrogel interzelluläre Verbindungen unter Bildung eines Zellnetzwerkes aus. Des Weiteren wurde ein CTB-Test mit MSC im FF-Hydrogel durchgeführt, um die Proliferation der Zellen zu untersuchen. Die Glucose- und Lactatkonzentrationen wurden ebenfalls regelmäßig während der Kultivierung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.52 zusammengefasst. Wie bei der Kultivierung der MSC im PF-Hydrogel ist binnen 7 Kultivierungstagen ein Anstieg des

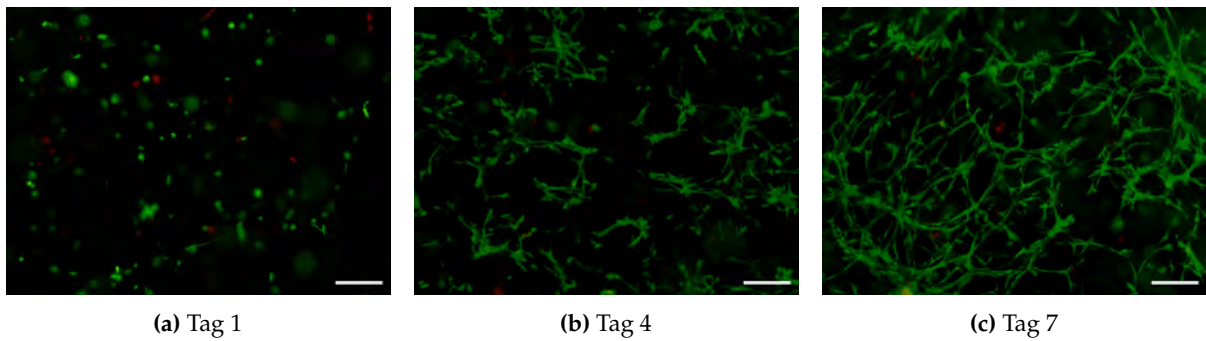


Abbildung 4.51 Fluoreszenzaufnahmen von MSC in FF-Hydrogelkonstrukten an Tag 1, Tag 4 und Tag 7. Viable Zellen wurden mit Calcein-AM (grün) und tote Zellen mit Propidiumiodid (rot) gefärbt, Messbalken: 200 μm .

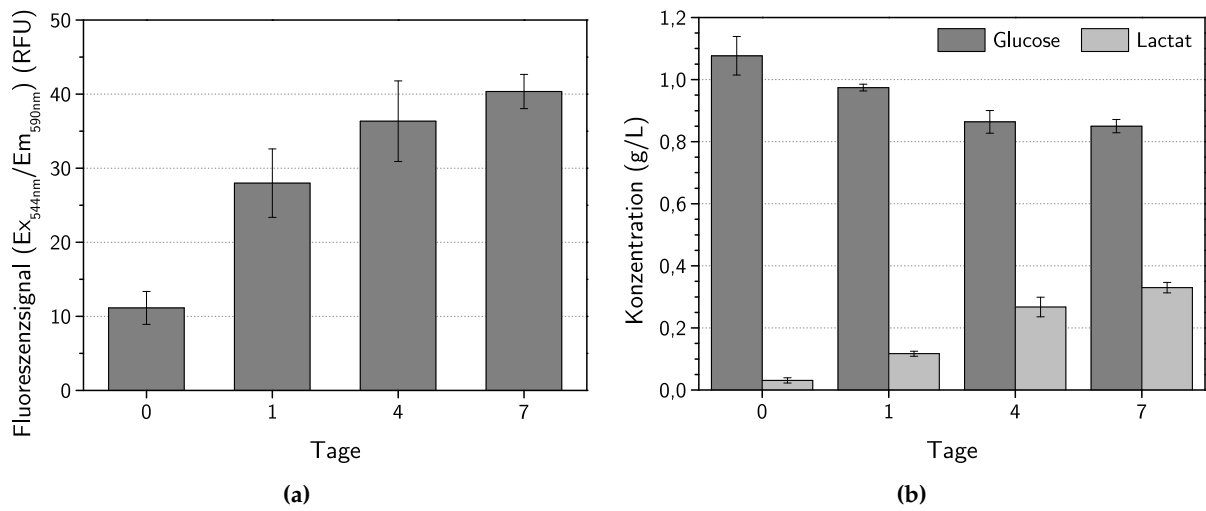


Abbildung 4.52 Kultivierung von MSC in FF-Hydrogelkonstrukten: (a) Viabilitätsbestimmung mittels CTB-Test und (b) Glucose- und Lactatkonzentrationen nach unterschiedlichen Kultivierungstagen.

Fluoreszenzsignals zu erkennen. Das Fluoreszenzsignal liegt vergleichsweise niedriger, wobei die Tendenz vergleichbar mit der PF-Hydrogelkultivierung ist. Auch die Abnahme der Glucosekonzentration und die Zunahme der Lactatkonzentration weisen auf eine Proliferation der MSC im FF-Hydrogelkonstrukt hin. Die Experimente zeigen, dass Zellen auch im FF-Hydrogel proliferieren und über 7 Tage zu einem dreidimensionalen Zellnetzwerk wachsen, wenn das Hydrogel durch UV-Licht irreversibel polymerisiert wird.

4.4.4 Verkapselung tierischer Zellen in Mikropartikeln

In Abschnitt 4.3 konnte gezeigt werden, dass robuste Hefezellen mittels Encapsulator erfolgreich in Mikropartikeln verkapselt und kultiviert werden können. Ob die Verkapselungsmethoden milde genug sind, so dass auch tierische Zellen den Prozess überstehen, wurde in weiteren Experimenten untersucht. Da tierische Zellen in Ca-Alginat-Partikeln aufgrund der dichten Polymerstruktur nur geringfügig gewachsen sind, wurden Mikrokapseln aus Natriumcellulosesulfat (NaCS) für die Verkapselung gewählt. Beim Eintropfen einer NaCS-Lösung in Polydiallyldimethylammoniumchlorid (pDADMAC) bildet sich, ähnlich wie bei

Ca-Alginat-Partikeln, eine feste Hüllstruktur aus, so dass Mikropartikel ebenfalls mittels Encapsulator produziert werden können. Die Polymerstruktur weist jedoch, anders als die Fibrinogen-basierten Hydrogele, keine Möglichkeit zur Zelladhäsion auf.

Für die Verkapselung wurde daher die Zelllinie Hep-G2 gewählt. In Abbildung 4.33 wurde bereits gezeigt, dass die Zellen in einem dreidimensionalen Hydrogel als runde Zellcluster wachsen und kein Migrationsvermögen aufweisen. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Zellen in einem soliden 3D System nicht auf die Adhäsion an eine Protein-funktionalisierte Polymermatrix angewiesen sind und dadurch das Wachstum der Zellen in NaCS-pDADMAC-Mikropartikeln möglich wäre.

Zur Verkapselung wurden 1 Mio. Z/mL in einer 2 % NaCS-Lösung (Euroferm, Erlangen) suspendiert und mittels Encapsulator in eine 1,2 % pDADMAC (100 bis 200 kDa, 20 % wässrige Lösung) vertropft. Die Mikrokapseln wurden mit einer 150 µm Düse bei 1500 Hz, 900 V und einem Volumenstrom von 2,0 mL/min hergestellt. Die generierten Mikrokapseln wiesen einen mittleren Durchmesser von 310 µm und sind exemplarisch in Abbildung 4.53b nach 6 Kultivierungstagen dargestellt. Die Partikel zeigen zum Teil spitzenförmige Abrisspunkte, die wie längliche Tropfen aussehen. Dies ist auf eine Interaktion des Tropfens mit der Oberfläche des Härtingsbad (pDADMAC) zurückzuführen. Wegen der Oberflächenspannung kann es vorkommen, dass kleine Tropfen nicht sofort komplett in das Härtingsbad eintauchen und kurze Zeit an der Oberfläche verweilen. Dadurch kann sich der Tropfen in die Länge ziehen, so dass der Mikropartikel nicht vollständig rund erscheint. Abhilfe kann der Einsatz nichtionischer Tenside wie zum Beispiel Tween 20 schaffen, welche die Oberflächenspannung verringern. Die Charakterisierung und Optimierung der NaCS-pDADMAC-Mikropartikel hinsichtlich ihrer Exzentrizität und Parameter wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Nach dem Verkapselungsprozess wurden die Mikropartikel, die einen Durchmesser von 324 µm aufwiesen, in einer Zellkulturplatte mit 6 Kavitäten bei 37 °C und 5 % CO₂ bei 40 rpm für 12 Tage inkubiert. Dazu wurden jeweils 20 Mikrokapseln in einer Kavität mit 4 mL Medium kultiviert. Die Glucose- und Lactatkonzentrationen wurden täglich analysiert und sind in Abbildung 4.53a dargestellt. Um die Zellen ausreichend mit Nährstoffen zu versorgen, wurde das Medium alle 3 Tage durch neues Medium ersetzt.

Die Glucosekonzentration zeigt innerhalb der ersten 6 Kultivierungstagen aufgrund der geringen Zellzahl kaum eine Änderung. Erst ab Tag 6 ist ein Glucoseverbrauch zu beobachten, der ab Tag 9 noch deutlicher zu erkennen ist. Die Glucosekonzentration sinkt zwischen Tag 9 und Tag 12 von 4,5 g/L auf 3,1 g/L. Die Lactatkonzentration ist zu Beginn der Kultivierung gering, steigt jedoch innerhalb der ersten 4 Tage auf 0,1 g/L an. Nach jedem Mediumwechsel ist die Steigung der Lactatkonzentration größer, so dass nach Tag 12 eine maximale Lactatkonzentration von 1,1 g/L erreicht wird. Darüber hinaus ist über den Kultivierungsverlauf ein exponentieller Anstieg des Lactatgehalts zu beobachten. Da die Glucosekonzentration abnimmt und die Lactatkonzentration deutlich zunimmt ist davon auszugehen, dass die verkapselten Hep-G2-Zellen innerhalb der Mikrokapseln wachsen.

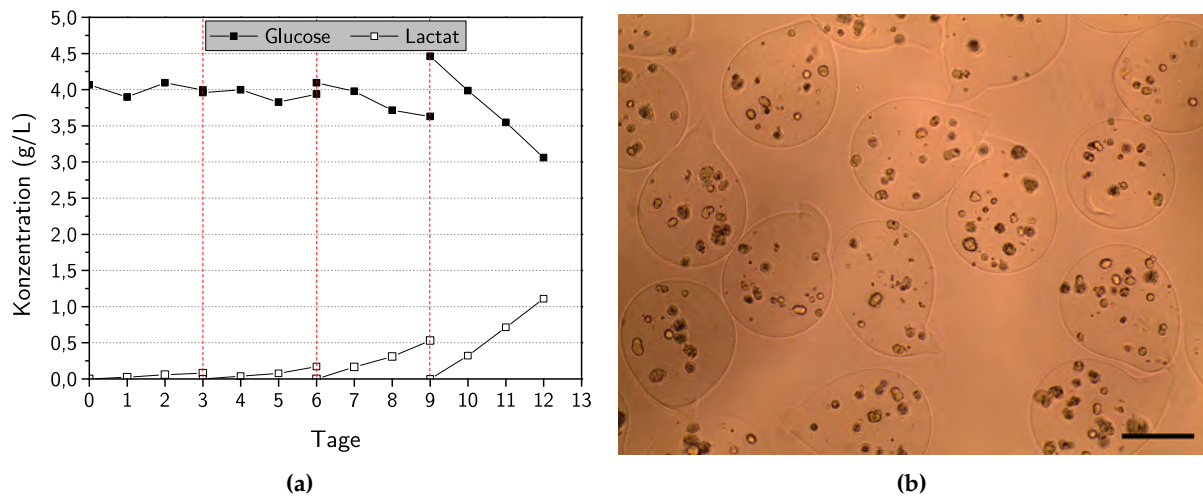


Abbildung 4.53 Kultivierung von Hep-G2-Zellen in Mikropartikeln aus Natrium-Cellulosesulfat: (a) Glucose- und Lactatkonzentrationen in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer (SD < 2,4 %). Das Medium wurde alle 3 Tage durch neues Medium ersetzt (rote Linien). (b) NaCS-pDADMAC-Mikropartikel mit immobilisierten Hep-G2-Zellen nach 6 Tagen, Partikel-Ø = 324 µm, Messbalken: 200 µm.

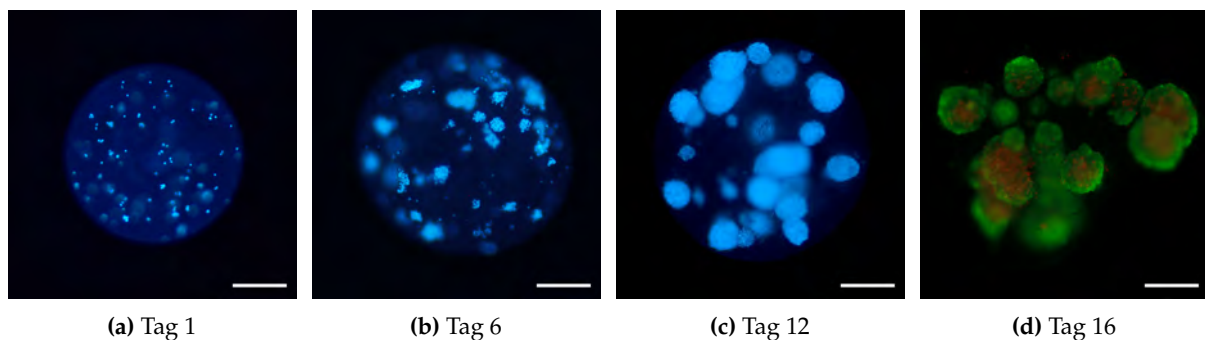


Abbildung 4.54 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Hep-G2-Zellen in NaCS-pDADMAC-Mikropartikeln: DAPI-Färbung nach 1, 6 und 12 Tagen, Messbalken: 200 µm und Lebend-Tot-Färbung nach Tag 16, Messbalken: 100 µm.

Um die Ergebnisse visuell überprüfen zu können, wurden die Zellkerne der verkapselten Zellen in den Mikropartikel nach unterschiedlichen Tagen mit DAPI gefärbt. Die mikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 4.54 gezeigt. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass zu Beginn der Kultivierung (Tag 1) nur wenige, einzelne Zellen im Mikropartikel vorliegen. Nach 6 Tagen sind die Zellen zu kleinen Zellclustern gewachsen, die sich bis zum Ende der Kultivierung (Tag 12) beachtlich vergrößert haben. Eine Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM und Propidiumiodid ist nach 16 Tagen Kultivierung in Abbildung 4.54d gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Zellcluster teilweise einen nekrotischen Kern mit einigen toten Zellen gebildet haben, während die äußere Region eine hohe Zellviabilität aufweist. Der Aufbau der Zellaggregate ist vergleichbar mit den Strukturen von Zellsphäroiden. Die toten Zellen im Inneren sind daher auf eine Nährstofflimitierung infolge mangelnder Diffusion zurückzuführen.

Es wurde gezeigt, dass Hep-G2-Zellen in NaCS-pDADMAC-Mikropartikel kultiviert werden können. Die Zellen wachsen dabei analog zu den Hep-G2-Zellen im PF-Hydrogel als runde Zellcluster. Dies bedeutet, dass mit dem Encapsulator nicht nur robuste Hefezellen, sondern

auch tierische Zelllinien verkapselt werden können. Im folgenden Abschnitt wird geklärt, ob mesenchymale Stammzellen in Mikropartikeln bzw. Mikrokapseln aus Fibrinogen-basierten Hydrogelen kultiviert werden können und ein Zellnetzwerk aufbauen.

4.4.5 Verkapselung mesenchymaler Stammzellen in Core-Shell-Mikrokapseln

In Abschnitt 4.4.3 wurde gezeigt, dass MSC in den Fibrinogen-basierten PF- und FF-Hydrogelen ein dreidimensionales Zellnetzwerk ausbilden. Da die Polymerisationszeit der Hydrogele zwischen 2 min und 4 min beträgt, und damit deutlich länger dauert als die ionotrope Gelbildung bei der Verwendung einer Na-Alginatlösung, können mittels Encapsulator keine Mikropartikel aus den Fibrinogen-basierten Hydrogelen hergestellt werden. Es wurden daher Alternativen gesucht, um die Kultivierung von MSC in Partikeln zu ermöglichen. Eine Suspension aus Fibrinogen-basiertem Hydrogel und einer NaCS- oder Na-Alginatlösung im Verhältnis 1:2 ermöglicht zwar die Partikelproduktion, allerdings bleibt das gewünschte Zellwachstum aus. Dies ist auf die veränderte Polymerstruktur der Hydrogele zurückzuführen, da sich durch das Mischen zweier flüssiger Hydrogele neben den mechanischen Eigenschaften auch der Proteinanteil im Hydrogel ändert. Dadurch liegen keine optimalen Wachstumsbedingungen für die Zellen vor.

Daher wurden, wie in Abschnitt 4.1.4 gezeigt, Core-Shell-Mikrokapseln mit einer Ca-Alginathülle und einem Kernbereich aus Fibrinogen-basiertem Hydrogel und MSC hergestellt. Für die Kernflüssigkeit wurden 1 Mio. Z/mL in PF- bzw. FF-Hydrogel suspendiert. Als Hüllstruktur diente eine 1,5 % Na-Alginatlösung. Die Core-Shell-Mikrokapseln wurden mittels Encapsulator mit einem konzentrischen Düsensystem mit Düsendurchmessern von 150 μm und 200 μm bei 900 Hz, 1400 V bis 1900 V, 380 mbar und einer Pumprate von 1 mL/min generiert. Die Mikrokapseln wurden anschließend für 2 Minuten mit UV-Licht polymerisiert und über einen Zeitraum von 7 Tagen in gerührten Systemen kultiviert.

Um das Wachstum der Zellen zu dokumentieren, wurden von den Mikrokapseln an Tag 0, 1, 4 und 7 mikroskopische Bilder aufgenommen. Diese sind in Abbildung 4.55 gezeigt. Ähnlich wie bei der Kultivierung von MSC in größeren 3D Hydrogelkonstrukten (Abschnitt 4.4.3) haben die runden Zellen nach einem Tag begonnen sich im Hydrogel an die Polymermatrix zu adhären. Bis zu Tag 7 ist eine deutliche Proliferation und Bildung eines Zellnetzwerks zu erkennen.

Einen Überblick über die produzierten Mikrokapseln gibt Abbildung 4.56a. Hierbei ist zu erkennen, dass Mikrokapseln gleicher Größe mit einem Durchmesser von 519 μm generiert werden konnten. Die Core-Bereiche sind allerdings nicht bei allen Partikeln rund, sondern weisen oftmals eine oval-längliche Form auf. Der Aufbau einer Mikrokapsel (Tag 0) und eine Lebend-Tot-Färbung nach 7 Kultivierungstagen ist in Abbildung 4.56 gezeigt. Anhand der kontrastverstärkten mikroskopischen Aufnahme (Abb. 4.56b) ist zu erkennen, dass sich das PF-Hydrogel (Core) sichtbar vom Ca-Alginat (Shell) abgrenzt. Die verkapselten Zellen sind als helle, runde Objekte im Core-Bereich zu erkennen. Die Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM und

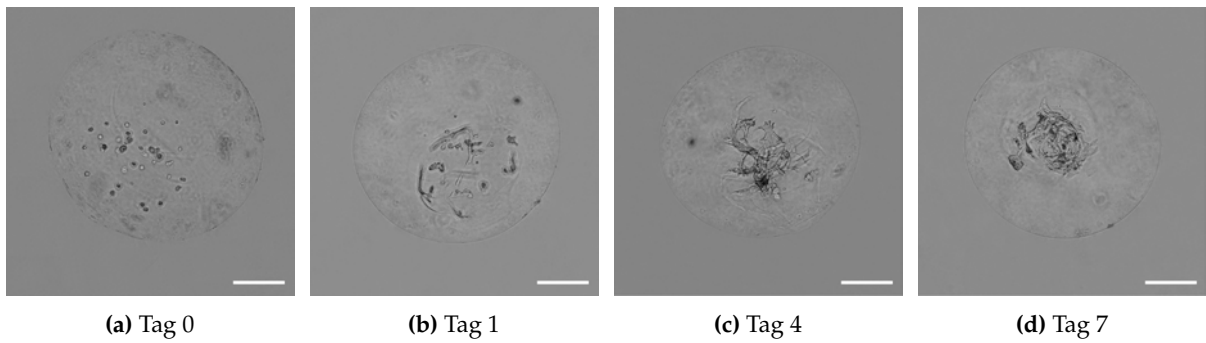


Abbildung 4.55 Mikroskopische Aufnahmen einer Alginat-PF-Hydrogel-Mikrokapsel mit immobilisierten MSC nach 0, 1, 4 und 7 Tagen, Messbalken: 200 μm .

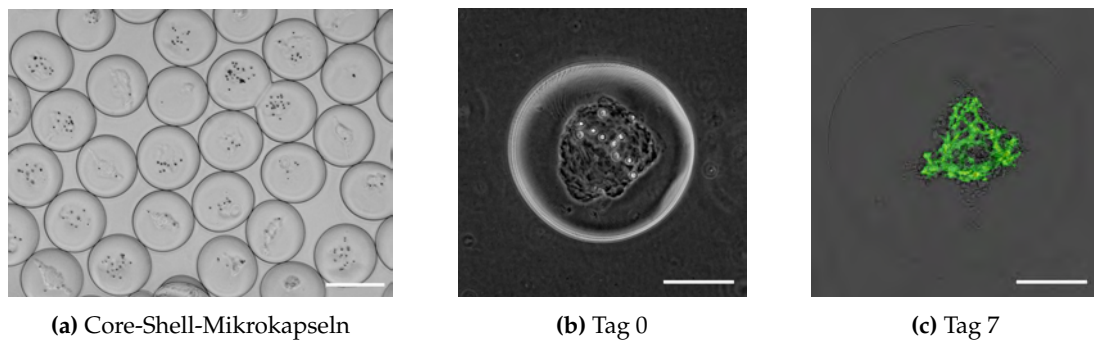


Abbildung 4.56 Kultivierung von MSC in Alginat-PF-Hydrogel-Mikrokapseln: (a) Generierte Core-Shell-Mikrokapseln im Überblick, Partikel- $\text{\O} = 519 \mu\text{m}$, Messbalken: 500 μm . (b) Core-Shell-Mikrokapsel nach dem Verkapselungsprozess an Tag 0. Das PF-Hydrogel (Core) grenzt sich sichtbar vom Ca-Alginat (Shell) ab. Die verkapselten Zellen sind als runde, helle Objekte im Core-Bereich zu erkennen. (c) Core-Shell-Mikrokapsel nach 7 Kultivierungstagen, Calcein-AM-Propidiumiodid-Färbung, Messbalken: 200 μm .

Propidiumiodid zeigt sehr deutlich, dass die MSC zu einem dreidimensionalen Zellnetzwerk gewachsen sind (Abb. 4.56c). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen durch die Ca-Alginat-Schale der Mikrokapseln ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Verkapselung von MSC in Core-Shell-Mikrokapseln aus einer Na-Alginatlösung und flüssigem Fibrinogen-basierten Hydrogelen mittels Encapsulator möglich ist und die Zellen in den Mikrokapseln wachsen. Der Encapsulator stellt somit eine Möglichkeit dar, auch tierische Zellen in Mikropartikeln oder Core-Shell-Mikrokapseln einzuschließen und zu kultivieren. Allerdings werden beim Herstellungsprozess der Mikrokapseln auch Partikel generiert, die nicht den Anforderungen entsprechen und zum Beispiel keinen runden Core-Bereich oder einen zu kleinen Core-Bereich aufweisen. Daher ist eine Prozessoptimierung notwendig, um Kultivierungen in größerem Maßstab durchführen zu können.

In Abschnitt 4.1.4 wurde dargestellt, dass Core-Shell-Mikrokapseln aus Alginat/Öl oder Alginat/Alginat vor allem runde Kernbereiche aufzeigen. Dabei weisen die Core- und Shell-Lösung entweder unterschiedliche Hydrophilien oder gleiche Viskositäten auf. Die unzureichende Uniformität der Core-Shell-Mikrokapseln aus Alginat/Fibrinogen-basierten Hydrogelen kann daher durch die stark unterschiedlichen Viskositäten bei entsprechenden Scherraten resultieren.

Die Viskositätsfunktionen der Na-Alginatlösung sowie der Fibrinogen-basierten Hydrogele wurden bereits in Abschnitt 4.2.2 gezeigt und die Problematik der unterschiedlichen Viskositäten in Bezug auf die Verkapselung mittels Encapsulator erläutert. Um uniforme Core-Shell-Mikrokapseln aus einer Na-Alginatlösung und Fibrinogen-basierten Hydrogelen herstellen zu können, müssen die PF- und FF-Hydrogele dahingehend optimiert werden, dass sie eine ähnliche Viskositätsfunktion wie die verwendete Na-Alginatlösung aufweisen. Eine weitere Alternative ist die Entwicklung neuartiger Hydrogele, die eine ionotrope Gelbildung oder eine vergleichbare Reaktion eingehen. Dadurch könnte auf den Einsatz von Core-Shell-Systemen verzichtet werden und ebenfalls Mikropartikel mittels Encapsulator für die Kultivierung tierischer Zellen in Suspension hergestellt werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Zellwachstums in soliden 3D Fibrinogen-basierten Hydrogelen, deren rheologische Charakterisierung sowie die Entwicklung von Hydrogel-Mikropartikeln zur Kultivierung tierischer Zellen in Suspension.

Dazu wurde eine reproduzierbare Methode zur Herstellung von soliden Hydrogelkonstrukten etabliert, die es erlaubt vielfältige Untersuchungen von Zellen in einer dreidimensionalen Umgebung durchzuführen. Es konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche immortalisierte Zelllinien in den soliden 3D Hydrogelkonstrukten unterschiedliche Zellmorphologien aufweisen und clusterförmige oder netzwerkartige Strukturen ausbilden. Im Vergleich zu einer entsprechenden 2D Kultur weisen die Zelllinien in einer dreidimensionalen Umgebung jedoch eine vergleichbare Morphologie auf. Mesenchymale Stammzellen bilden in den Hydrogelkonstrukten innerhalb weniger Tage ein kompaktes dreidimensionales Zellnetzwerk aus, das anhand mikroskopischer Aufnahmen und histologischer Schnitte beschrieben werden konnte. Anhand der Ergebnisse ist deutlich zu erkennen, dass die Zellen interzelluläre Verbindungen aufweisen. Zur Untersuchung des Zellwachstums wurde außerdem ein Proliferationstest sowie unterschiedliche Fluoreszenzfärbungen an die 3D Zellkultur angepasst. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen in den Hydrogelkonstrukten migrieren und proliferieren. Diese Ergebnisse werden durch die mikroskopischen Zeitrafferaufnahmen unterstützt. Die Zellen können mit einer hohen Viabilität in den Hydrogelkonstrukten immobilisiert werden und erhalten die Viabilität über eine Kultivierungsdauer von mindestens 7 Tagen aufrecht. Des Weiteren wurde eine Methode etabliert, um die Sauerstoffkonzentration innerhalb der Hydrogele zu bestimmen. Dazu wurden O₂-sensitive Fluorophore verwendet, die im flüssigen Hydrogel suspendiert und durch die anschließende Polymerisation in 3D Hydrogelkonstrukte eingeschlossen wurden. Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb des Hydrogels keine Sauerstofflimitierung auftritt und der Sauerstoffanteil in der Mitte eines Hydrogelkonstruktes deutlich höher liegt als in der Mitte eines Zellsphäroids mit gleicher Startzellzahl. Außerdem konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen erfolgreich in soliden 3D Hydrogelkonstrukten differenziert werden können und ihr Differenzierungsvermögen aufrechterhalten. Die rheologischen Untersuchungen der Fibrinogen-basierten Hydrogele ergaben, dass die Festigkeit der Hydrogele sowohl von der Intensität des UV-Lichts, der Bestrahlungsdauer als auch von der PEGDA-Konzentration abhängig ist. Die Polymerisationsreaktion läuft dabei nur so lange ab, wie das Hydrogel mit UV-Licht bestrahlt wird. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich die Festigkeit des PF-Hydrogels bei der Lagerung bei 4 °C über 90 Tage signifikant verringert. Die thermoreversiblen Eigenschaften des FF-Hydrogels konnten durch rheologische Messungen beschrieben werden.

Wird die Temperaturänderung mit der UV-Bestrahlung kombiniert, ist zu erkennen, dass die FF-Hydrogele eine höhere Festigkeit aufweisen, wenn sie zunächst mit UV-Licht polymerisiert werden und anschließend auf 37 °C erwärmt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Herstellung von Ca-Alginat-Mikropartikeln und Core-Shell-Mikrokapseln mittels Encapsulator B-395 Pro charakterisiert. Dabei konnten monodisperse Partikel reproduzierbar hergestellt werden. Außerdem wurden robuste Hefezellen erfolgreich in Mikropartikeln und Mikrokapseln kultiviert. Es konnte gezeigt werden, dass in den Mikrokapseln höhere Zellzahlen erreicht werden, als in einer vergleichbaren Kultivierung mit Mikropartikeln. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Zellen in den Core-Shell-Mikrokapseln in der Mitte der Partikel positioniert werden, während die Zellen in Mikropartikeln auch am Rand verkapselt werden und dadurch leicht in Suspension abgeben werden können. Mit einem bildbasierten Algorithmus konnten außerdem der Partikeldurchmesser sowie die Anzahl und die Größe der Hefezellcluster detektiert und ausgewertet werden. Dadurch konnte die durchschnittliche Zellzahl innerhalb der Mikropartikel bestimmt werden und eine gute Korrelation zu den offline-Messwerten aufgezeigt werden. Weitere Ergebnisse zeigen, dass auch Säugertierzellen wie Hep-G2-Zellen und MSC in Mikropartikeln bzw. Mikrokapseln mit einer hohen Viabilität immobilisiert und in Suspension kultiviert werden können. Die MSC bilden dabei analog zu den 3D Hydrogelkonstrukten auch in den sehr viel kleineren Core-Shell-Mikrokapseln ein dreidimensionales Zellnetzwerk aus.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass mit Fibrinogen-basierten Hydrogelen solide dreidimensionale Strukturen geschaffen werden können, in denen adhärente Zellen migrieren und proliferieren können. Somit ist der Einsatz von Hydrogelen als Transplantationsmatrix in der regenerativen Medizin und im Tissue Engineering zur Unterstützung des Heilungsprozesses oder gar zum vollständigen Ersatz von beschädigtem oder zerstörtem Gewebe denkbar. Insbesondere die Kultivierung von Stammzellen weist ein erhebliches Interesse auf, da die Zellen eine erneuerbare Quelle darstellen und als therapeutische Zellen verwendet werden können. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass monodisperse Core-Shell-Mikrokapseln aus Fibrinogen-basierten Hydrogelen aufgebaut werden können, die es erlauben adhärent wachsende MSC in Suspension zu kultivieren. Es ist somit denkbar, dass mit dieser Methode große Mengen an Stammzellen für regenerative Zelltherapien produziert werden können.

5.1 Beurteilung des Encapsulators für die Verkapselung tierischer Zellen

Der Encapsulator B-395 Pro eignet sich zur Herstellung uniformer Mikropartikel mit einer sehr schmalen Größenverteilung. Die Varianz der Mikropartikel ist dabei abhängig von dem Düsendurchmesser und steigt mit der Partikelgröße an. Werden Mikropartikel innerhalb der Betriebskennfelder produziert, kann dennoch für alle Düsendurchmesser eine Standardabweichung unter 5 % erzielt werden. Eine Ausnahme stellt dabei die Verkapselung einer hohen

Zellkonzentration in Mikropartikel dar, da Zellen den regelmäßigen Strahlzerfall stören können. Außerhalb des Betriebskennfeldes liegt die prozentuale Standardabweichung deutlich über 5%. Die Reproduzierbarkeit der Partikeldurchmesser nach vollständiger Demontage der Produktionseinheit liegt unter 8% (Abschnitt 4.1). Durch die Vielzahl unterschiedlicher Düsendurchmesser stehen viele Variationsmöglichkeiten zur Verfügung, so dass Partikel mit Durchmessern von etwa 160 µm bis 2000 µm produziert werden können. Die Überwachung der Partikelproduktion erfolgt mittels Stroboskoplampe, die den Prozess visualisiert und eine Echtzeitkontrolle ermöglicht.

Für die Verkapselung tierischer Zellen stehen unterschiedliche biokompatible Materialien zur Verfügung. Mikropartikel können jedoch nur aus Polymerlösungen hergestellt werden, die einen schnellen Gelierungsprozess durch Vertropfen in ein Härtingsbad eingehen. Dazu zählen unter anderem Lösungen aus Na-Alginat oder Na-Cellulosesulfat. In Abschnitt 4.3 und 4.4 wurde gezeigt, dass sowohl Hefezellen als auch tierische Zellen und Primärzellen mit einer hohen Viabilität unter milden und physiologischen Bedingungen verkapselt werden können. Dabei wurden die verschiedenen Zellen in Mikropartikeln und in Core-Shell-Mikrokapseln verkapselt und erfolgreich in Suspension kultiviert.

Um eine sterile Verkapselung der Zellen zu erreichen, muss der Encapsulator unter der Sterilwerkbank platziert werden. Dort nimmt er aufgrund der Größe (32x38x48 cm) eine verhältnismäßig große Fläche ein, so dass eine Sterilwerkbank mit einer Länge von 120 cm und einer Tiefe von 60 cm mindestens zur Verfügung stehen sollte, um ausreichend Platz zur Bedienung und für weiteres Equipment zu haben. Unter der Sterilwerkbank können der laminare Luftstrom und Vibrationen, die durch das Lüftungssystem entstehen, den Strahlzerfall des Encapsulators negativ beeinflussen. Dies führt insbesondere bei der Produktion von Core-Shell-Mikrokapseln zu Partikeln, die eine höhere Standardabweichung aufweisen.

Durch die Installation eines Glasreaktors, der optional erhältlich ist, kann das Problem verringert werden. Der Glasbehälter wird direkt unter der Pulschamber montiert und schirmt die Partikelproduktion vollständig ab, so dass der Luftstrom der Sterilwerkbank keinen Einfluss auf den Prozess hat. Die Installation lohnt sich jedoch nur, wenn eine große Menge an Partikeln, zum Beispiel für die Kultivierung in einem Bioreaktor, benötigt wird, da die Handhabung des Glasreaktors aufwendig ist. Außerdem sind deutlich größere Volumina an Vernetzungs- und Waschlösungen erforderlich. Ein großer Nachteil ist auch, dass mittels Glasreaktor nur ein Batch produziert werden kann, da das System anschließend gereinigt und autoklaviert werden muss. In der Forschung und Entwicklung ist es jedoch von Vorteil Mikropartikel bei unterschiedlichen Parametern zu produzieren, um Kultivierungen parallel durchführen und miteinander vergleichen zu können. Daher wurde in dieser Arbeit weitestgehend von der Verwendung des Glasreaktors abgesehen.

Bei der Herstellung der Partikel muss darauf geachtet werden, dass die Partikel kontinuierlich hergestellt werden. Wird die Produktion ausgesetzt, kann die Polymerlösung innerhalb der Düse eintrocknen und die Düse verstopfen. Dies macht die komplette Demontage und Reinigung

der Pulschammer erforderlich. Um Partikel mit unterschiedlichen Parametern produzieren zu können, muss die Pulschammer unmittelbar nach jedem Produktionsprozess mit sterilem Wasser gespült werden. Die Pulschammer selbst ist komplett autoklavierbar und lässt sich auch unter sterilen Bedingungen problemlos am Encapsulator installieren. Da die Pulschammer mit der Düse vor jeder Produktion sterilisiert werden muss, ist es ausschließlich bei der Verwendung mehrerer Pulschammern möglich auch mehrere Düsen für ein Experiment zu verwenden. Dies schränkt den Einsatzbereich des Encapsulators geringfügig ein.

Bei starker oder dauerhafter Belastung der PTFE-Membran, die an der Pulschammer die Vibrationen überträgt, kann die Membran reißen. Dies ist nicht direkt während des Produktionsprozesses erkennbar, sondern zeigt sich erst unter dem Mikroskop wenn die Partikel begutachtet werden bzw. nach der Demontage der Pulschammer. Eine gute Alternative bietet eine neu konzipierte Edelmetallmembran (Abb. 4.3c), die deutlich stabiler ist als die PTFE-Membran und vergleichbare Ergebnisse liefert.

Insgesamt stellt der Encapsulator eine geeignete Möglichkeit dar, tierische Zellen in solide 3D Hydrogel-Mikropartikeln zu verkapseln. Aufgrund der Variationsmöglichkeiten, dazu zählen neben der Partikelgröße und dem Partikeltyp auch die Auswahl an Biopolymeren und Zellen, ist der Encapsulator insbesondere für die Forschung und Entwicklung geeignet und ideal für die Verarbeitung von Polymerlösungen bis 500 mL. Außerdem fallen durch den Einsatz autoklavierbarer Bauteile keine hohen Kosten für Einwegartikel an.

5.2 Beurteilung der Fibrinogen-basierten Hydrogele zur Kultivierung tierischer Zellen

Die in dieser Arbeit untersuchten Fibrinogen-basierten PF- und FF-Hydrogele eignen sich sowohl zur Kultivierung tierischer Zelllinien als auch humaner mesenchymaler Stammzellen in dreidimensionalen Systemen. Adhärenz wachsende Zellen wechselwirken über ihre Integrinbindestellen mit dem an die Polymerstruktur kovalent gebundenen Fibrinogen, so dass die Zellen innerhalb eines soliden Hydrogels adhären und migrieren können. Durch die Zellproliferation bilden NIH-3T3-Zellen und MSC netzartige Strukturen in einer dreidimensionalen Hydrogelstruktur aus, während sich Hep-G2- und Suspensionszellen in Zellclustern organisieren.

Die Hydrogele liegen als transparente, flüssige Lösungen vor und können daher problemlos pipettiert werden. Dies ermöglicht es, solide Hydrogelkonstrukte zum Beispiel mit unterschiedlichen PEGDA-Konzentrationen reproduzierbar herzustellen. Die Vernetzung beider Hydrogele wird durch die Bestrahlung mit UV-Licht für 2 min erreicht. Dabei wird die Festigkeit der Hydrogele neben dem Energieeintrag durch UV-Licht (Intensität und Dauer) ebenso durch die Konzentration an PEGDA beeinflusst. Dies muss bei der Herstellung der Konstrukte berücksichtigt werden. Außerdem verändert sich die Festigkeit des FF-Hydrogels durch

Tabelle 5.1 Vor- und Nachteile der PF- und FF-Hydrogele

Parameter	PF-Hydrogel	FF-Hydrogel
Handhabung	gut pipettierbar	gut pipettierbar
Vernetzung	UV-Licht	UV-Licht & Temperatur
Polymerisationszeit	2 min	2 min
Farbe solider Konstrukte	transparent	milchig-trüb
Festigkeit	gelartig-fest	gelartig
Durchlichtmikroskopie	sehr gut	nicht möglich
Fluoreszenzfärbungen	sehr gut	gut
Mikrotomschnitte	sehr gut	gut
Lagerstabilität	unzureichend	unzureichend

Temperaturänderung. Werden FF-Hydrogele jedoch nur durch die Änderung der Temperatur physikalisch vernetzt, lösen sich die Konstrukte im Medium innerhalb von 48 h auf, so dass keine Kultivierungen über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden können.

Nach der Polymerisation liegt das PF-Hydrogel transparent vor, während das FF-Hydrogel milchig-trüb erscheint. Daher können lediglich Zellen in PF-Hydrogelen mittels Durchlichtmikroskopie beobachtet werden. Immobilisierte Zellen beider Hydrogeltypen können jedoch mit Fluoreszenzfarbstoffen wie Phalloidin, DAPI, Calcein-AM oder Propidiumiodid gefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Allerdings resultiert die Trübung des FF-Hydrogels in einem höheren Hintergrundrauschen, das die Auswertung der mikroskopischen Bilder erschwert. Generell gilt, dass mikroskopische Beobachtungen von Zellen in 3D Systemen schwierig zu interpretieren sind, da nicht alle Ebenen gleichzeitig fokussiert werden können. So führen Beobachtungen dreidimensionaler Zellstrukturen mit den verwendeten Verfahren immer zu zweidimensionalen Abbildungen. Um gute Ergebnisse erzielen zu können, müssen bei Färbungen die Inkubationszeit und Konzentration der Färbelösungen auf die Größe der Hydrogelkonstrukte spezifisch angepasst werden.

Eine weitere Möglichkeit Einblicke in das Innere eines Hydrogelkonstruktes zu bekommen ist der Einsatz der Mikrotomtechnik. Dabei werden dreidimensionale Hydrogelkonstrukte in dünne Scheiben geschnitten, die anschließend für weitere Analysen verwendet werden können. Histologische Schnitte können sowohl mit PF- als auch mit FF-Hydrogelkonstrukten hergestellt werden, wenn die Zellen ein dichtes Zellnetzwerk aufgebaut haben.

Der größte Nachteil der Fibrinogen-basierten Hydrogele ist die geringe Lagerstabilität. Die Hydrogele ändern ihre Festigkeit signifikant über einen Zeitraum von 3 Monaten, so dass Vergleiche und reproduzierbare Ergebnisse von Kultivierungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nur bedingt möglich sind. Alle Vor- und Nachteile der Fibrinogen-basierten Hydrogele sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

5.3 Herausforderungen in der Zukunft

Die vielen verschiedenen Anwendungsgebiete weisen unterschiedliche Anforderungen an die Hydrogele auf. Es gibt daher nicht nur ein erfolgreiches Rezept für die Kultivierung von Zellen in soliden 3D Systemen. Vielmehr gibt es Unmengen an natürlichen und synthetischen Materialien, die alle ihre eigenen Vor- und Nachteile aufweisen. Dennoch hat sich gezeigt, dass semisynthetische Hydrogele bereits heute eine zentrale Rolle in der 3D Zellkultur einnehmen und sich kontinuierlich etablieren. Der große Erfolg semisynthetischer Hydrogele ist darauf zurückzuführen, dass die einzelnen Bausteine, wie Polymere oder Proteinkomponenten, speziell an die Eigenschaften, die für ein Experiment oder eine Applikation erforderlich sind, angepasst werden können. Die Entwicklung weiterer chemischer Reaktionen, wie zum Beispiel die Klickchemie, wird eine Vielzahl an unterschiedlichen Vernetzungsvarianten hervorbringen. Diese wiederum stehen für neue Synthesestrategien bereit, so dass neuartige semisynthetische Hydrogele hergestellt werden können.

Die aktuelle Herausforderung besteht in der Herstellung von Hydrogelen, die dynamische Eigenschaften der extrazellulären Matrix möglichst präzise imitieren. Dabei werden in der Zukunft Techniken an Bedeutung gewinnen, die eine räumliche sowie zeitliche Kontrolle der Hydrogeleigenschaften ermöglichen. Dazu zählt beispielsweise der für verkapselte Zellen zeitlich begrenzte Zugang zu bioaktiven Stoffen. Um den Zellen dynamische Signale präsentieren zu können, sind jedoch eine Vielzahl reversibler Funktionalisierungen und unterschiedliche Synthesestrategien notwendig. Die Funktionalisierungen würden eine unabhängige Kontrolle der mechanischen Eigenschaften sowie biochemischer Signale innerhalb des Hydrogels ermöglichen.

Eine weitere Herausforderung der 3D Zellkulturtechnologie ist die Herstellung komplexer 3D Hydrogelkonstrukte wie zum Beispiel tunnelartiger Strukturen, die dem Gefäßsystem ähneln. Um solche Mikroorganstrukturen aus Hydrogelen und Zellen aufzubauen, wurden bereits Technologien wie Rapid Prototyping, die weiche Lithographie und das Elektrospritzverfahren verwendet. Die Verfahren sind sowohl für das Tissue Engineering als auch für die Grundlagenforschung äußerst vielversprechend. Hinsichtlich dieser Technologien bedarf es jedoch weiterer Entwicklung, da es den Konstrukten an mechanischer Stabilität mangelt oder die mikrofluidischen Strukturen nur unzureichend durchströmt werden. Neben der Entwicklung benutzerdefinierter, dynamischer Hydrogele und Mikroproduktionsmethoden bleibt somit noch ausreichend Raum für die Optimierung von Standardprotokollen zur Analyse Hydrogel-basierter 3D Konstrukte. So müssen beispielsweise analytische Verfahren, Überwachungsmethoden sowie die Lagerstabilität von Hydrogelen verbessert werden.

Die Entwicklung biomimetischer Hydrogele ist ein hochdynamisches Forschungsgebiet, das Wissenschaftler aus verschiedenen Disziplinen vereint. Während sich die Forschung immer noch mit den oben erwähnten Problemen und notwendigen Verbesserungen befasst, stellen Hydrogele dennoch zweifelsfrei eine geeignete Möglichkeit für die Kultivierung tierischer Zellen in dreidimensionalen Systemen dar. Hydrogele werden daher nicht nur zu einem besseren

Verständnis grundlegender zellulärer Prozesse *in vivo* beitragen, sondern auch Tumormodelle verbessern und neue Möglichkeiten für das Wirkstoffenscreening hervorbringen sowie zu Durchbrüchen im Tissue Engineering und zellbasierter Therapien verhelfen.

A Anhang: Material

A.1 Hefe- und Säugetierzellen

Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*)

Zur Verkapselung von Hefezellen in Ca-Alginat-Mikropartikel wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* des Stammes NCYC 1024 verwendet. Die Kultivierungen wurden in 100 mL acidifiziertem YM-Medium bei 28 °C und 150 rpm in 250 mL Erlenmeyerkolben durchgeführt. Dazu wurde das Medium aseptisch in einen Erlenmeyerkolben gegeben und mit einer Lagerkultur beimpft. Zur Stammerhaltung wurde ein Ausstrich einer Vorkultur auf YM-Agar ausplattiert und für 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Petrischalen wurden anschließend für maximal 6 Wochen im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

CHO-Zellen (Eierstockzellen des chinesischen Hamsters, an Suspension adaptiert)

Die Zelllinie CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary Klon 1) wurde von der Universität Bielefeld, Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik, zur Verfügung gestellt und wurde bereits an ein Wachstum in Suspension adaptiert. Bei der Ursprungszelllinie handelt es sich um die von ATCC stammende CHO-Zelllinie CCL-61. CHO-Zellen wurden im Jahr 1957 als erste kontinuierliche Zelllinie aus den Eierstöcken eines Hamsters isoliert und in Kultur genommen. Die Zellen verfügen über eine hohe Teilungsfähigkeit und bilden zusammen mit den Fibrozyten die zellulären Bestandteile des Bindegewebes. CHO-Zellen sind für die Expression rekombinanter Proteine bestens geeignet, so dass heute fast 70 % aller rekombinant hergestellten pharmazeutischen Wirkstoffe in CHO-Zellen exprimiert werden. Die Zellen wurden in gebrauchsfertigem CHOMACS CD Kulturmedium (Miltenyi Biotech GmbH) mit 8 mmol L-Glutamin kultiviert.

NIH-3T3-Zellen (Murine embryonale Fibroblastenzelllinie)

Diese Zelllinie hat ihren Ursprung in einem Kontakt-inhibierten NIH *Swiss mouse* Embryo. Die Fibroblasten wachsen adhärent in einfachen Schichten (Abb. A.1a). Sie weisen eine kurze Verdopplungszeit von rund 20 h auf und gehören somit zu schnell wachsenden Zellen. Die Kultur sollte nicht vollständig konfluent werden, da die Zellen sonst verstärkt EZM-Proteine bilden. Die Zellen werden in DMEM-Flüssigmedium mit 4,5 g/L Glucose, 10 % NKS, 1 % P/S kultiviert und alle 3 bis 5 Tage mit Trypsin/EDTA vereinzelt und 1:10 geteilt (DSMZ ACC-59).

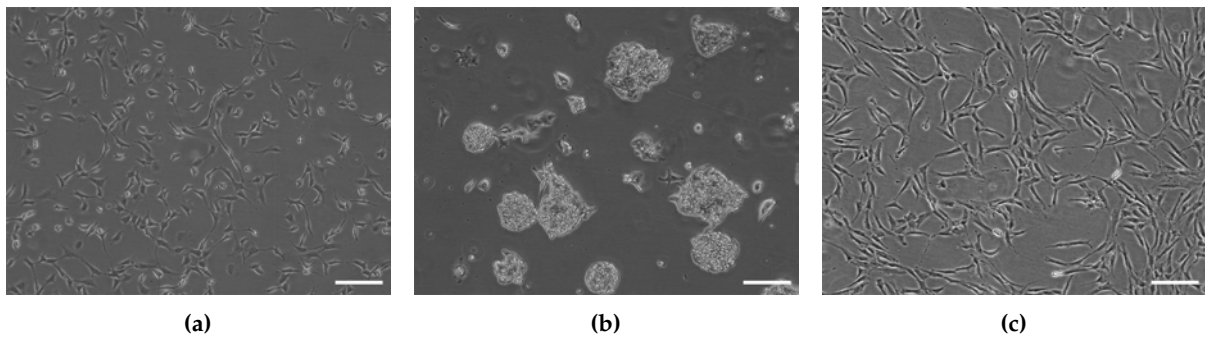


Abbildung A.1 Adhärenz Zellen in 2D Kultur: (a) NIH-3T3-Zellen, (b) Hep-G2-Zellen und (c) mesenchymale Stammzellen, Messbalken: 200 μm .

Hep-G2-Zellen (Humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie)

Hep-G2-Zellen wurden 1975 aus dem Tumorgewebe eines 15-jährigen Jungen entnommen und etabliert. Es handelt sich um adhärenz und epithel-ähnlich wachsende Zellen, die Aggregate bilden und eine Verdopplungszeit von 50 h bis 60 h aufweisen (Abb. A.1b). Die Zellen werden in DMEM-Flüssigmedium mit 4,5 g/L Glucose, 10 % FKS, 1 % P/S kultiviert und alle 4 bis 6 Tage mit Trypsin/EDTA abgelöst und in einem Verhältnis von 1:4 geteilt (DSMZ ACC-180).

MSC (humane Stammzellen, isoliert aus dem Fettgewebe)

Die adulten mesenchymalen Stammzellen (MSC) wurden aus dem Fettgewebe einer 44-jährigen Patientin nach einer Abdominoplastik gewonnen (Abb. A.1c). MSC sind multipotente Stromazellen, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung besitzen. Sie sind in fast allen postnatalen Geweben zu finden und werden unter anderem für die Gewebegeneration eingesetzt. Über Abbildung A.2 können Zeitrafferaufnahmen einer Kultivierung von MSC sowie einer Migration von MSC in 2D Kultur abgerufen werden. Die Zellen werden in α MEM-Flüssigmedium mit 1,0 g/L Glucose, 10 % HS, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Gentamycin kultiviert. Bei einer Konfluenz von 70 % werden die Zellen mit Accutase abgelöst und 1:10 geteilt. Die Isolation der MSC ist in Abschnitt B.1.4 beschrieben.

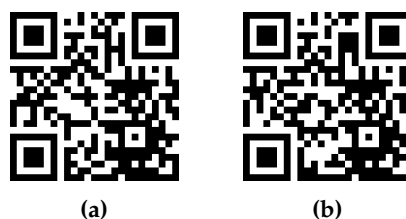


Abbildung A.2 QR-Codes zu den Zeitrafferaufnahmen des (a) Zellwachstums von MSC und (b) Migration von MSC in 2D Kultur.

A.2 Medien, Puffersysteme und Lösungen

Alle eingesetzten Medien, Puffersysteme und Lösungen wurden mit destilliertem Wasser (dH₂O) angesetzt. Der pH-Wert wurde mit 1 N Salzsäure oder 1 N Natronlauge eingestellt. Die Lagerung der fertigen Medien erfolgte lichtgeschützt bei 4 °C.

A.2.1 Medien und Kultursubstratpräparate

Die Bestandteile des YM-Medium bzw. YM-Agar wurden unter Rühren vollständig gelöst, auf einen pH = 6,0 eingestellt und bei 121 °C und 2 bar für 20 min autoklaviert. Dazu wurde eine 400 g/L Glucose-Stammlösung verwendet, die separat autoklaviert und vor der Kultivierung dem Mediums hinzugegeben wurde.

YM-Medium 3,0 g Hefeextrakt, 3,0 g Malzextrakt, 5,0 g Sojapepton und 20 g Glucose add 1 L dH₂O.

YM-Agar 3,0 g Hefeextrakt, 3,0 g Malzextrakt, 5,0 g Sojapepton, 10 g Glucose, 20 g Agar add 1 L dH₂O.

Zur Herstellung der Kulturmedien für Säugetierzellen wurden die entsprechende Menge an Pulvermedium und NaHCO₃ unter Rühren vollständig aufgelöst und ein pH = 7,2 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit dH₂O auf das Endvolumen aufgefüllt und sofort 0,2 µm sterilfiltriert.

DMEM-Flüssigmedium 13,47 g DMEM-Pulver, 3,7 g NaHCO₃ add 1 L dH₂O.

MEM-Flüssigmedium 9,61 g MEM-Pulver, 2,2 g NaHCO₃ add 1 L dH₂O.

αMEM-Flüssigmedium 10,08 g αMEM-Pulver, 2,2 g NaHCO₃ add 1 L dH₂O.

A.2.2 Puffersysteme und Lösungen für die Zellkultivierung und Fluoreszenzfärbung

1x PBS 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,1 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH = 7,4, autoklaviert.

Trypsin/EDTA-Pufferlösung 1x Trypsin in PBS, 0,02 % EDTA, Lagerung bei 4 °C, bzw. Langzeitlagerung bei -20 °C.

PFA-Lösung (4 %) 200 mL dH₂O wurden auf 60 °C erhitzt und 10 g Paraformaldehyd unter Rühren hinzugefügt. Direkt im Anschluss wurden 50 µL NaOH (10 N) unter Rühren hinzugegeben. Wenn PFA vollständig gelöst war, wurden 25 mL 10x PBS hinzugefügt, mit dH₂O auf 250 mL aufgefüllt und 0,45 µm filtriert. Lagerung bei -20 °C.

DAPI-Färbepuffer 100 mM Tris (pH = 7,0), 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 0,1 % Nonidet-P40, 0,2 µm sterilfiltriert.

DAPI-Stammlösung 500 µg/mL DAPI in dH₂O, Lagerung bei 4 °C.

DAPI-Färbelösung 2 µL DAPI-Stammlösung/mL DAPI-Färbepuffer, Lagerung bei 4 °C.

Phalloidin-Atto 488-Stammlösung 10 nM in 500 µL DMSO/MeOH, Lagerung bei -20 °C.

Calcein-AM-Stammlösung 500 µg/mL Calcein-AM (1,005 mM) in DMSO, Lagerung bei -20 °C.

Propidiumiodid-Stammlösung 1 µg/mL Propidiumiodid (1,5 mM) in PBS, Lagerung bei 4 °C.

A.2.3 Fibrinogen-basierte Hydrogele

Die Fibrinogen-basierten Hydrogele (PF- und FF-Hydrogele) wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dror Seliktar am Technion, Department of Biomedical Engineering in Haifa, Israel entwickelt und synthetisiert [36]. Die chemische Synthese des PF-Hydrogels ist detailliert in Abschnitt B.2 beschrieben.

PEGDA-Lösung 100 µg PEGDA-Pulver (10 kDa) in 300 µL PBS.

Photoinitiator-Lösung 10 µg Photoinitiator (Irgacure[®] 2959) in 100 µL 70 % Ethanol.

A.2.4 Puffersysteme und Lösungen für die Verkapselung von Zellen

Na-Alginatlösungen In dieser Arbeit wurden verschiedene Na-Alginat, aus denen Lösungen unterschiedlicher Konzentration hergestellt wurden, verwendet. Für die Charakterisierung des Encapsulators sowie für die Verkapselung der Zellen wurde eine 1,5 % (w/v) Na-Alginatlösung verwendet. Dazu wurden 15 g Na-Alginat langsam unter starkem Rühren in 1 L dH₂O vollständig gelöst. Die Na-Alginatlösung wurde über einen Zeitraum von 24 h stark gerührt. Um den biologischen Abbau durch Mikroorganismen und die damit verbundene Verfälschung von Messergebnissen zu vermeiden, wurden die Na-Alginatlösungen sofort rheologisch vermessen. Für die Zellverkapselung wurde die Na-Alginatlösung sofort 0,2 µm sterilfiltriert. Die Na-Alginatlösungen wurden lichtgeschützt bei 4 °C für max. 2 Wochen gelagert.

CaCl₂-Lösungen Für die Charakterisierung des Encapsulators wurde eine 100 mM CaCl₂-Lösung verwendet, während die Lösung zur Verkapselung von Zellen zusätzlich mit 10 mM MOPS versetzt und 0,2 µm sterilfiltriert wurde (pH = 7,2).

MOPS-Puffer Die Pufferlösung zum Waschen der Mikropartikel bestand aus 10 mM MOPS und 150 mM NaCl (pH = 7,2).

Natriumcitrat-Lösung Zum Auflösen der Mikropartikel wurde eine Lösung mit 50 mM Natriumcitrat, 77 mM NaCl und 10 mM MOPS (pH = 7,2) verwendet. Die Lösung wurde 0,2 µm sterilfiltriert.

NaCS-Lösung Für die Verkapselung von Zellen in NaCS wurde eine 2 % (w/v) NaCS-Lösung in PBS verwendet. Die Lösung wurde für 24 h gerührt, durch Autoklavieren sterilisiert und anschließend für weitere 2 h bei RT gerührt.

pDADMAC-Lösung Zur Vernetzung der NaCS-Lösung wurde eine 1,2 % (w/v) pDADMAC-Lösung (100 - 200 kg/mol, 20 % in H₂O) verwendet. Die Lösung wurde für 2 h gerührt und durch Autoklavieren sterilisiert.

A.3 Geräte und Materialien

Tabelle A.1 Geräte und Hersteller

Produkt	Hersteller
Airbrushpistole	Conrad Electronic SE, Hirschau
Arium [®] 661 Ultrapure water system	Sartorius AG, Göttingen
Cedex AS20	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Cellometer [®] Auto T4	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Einfrierbehälter, Nalgene [®] Mr. Frosty	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Encapsulator B-395 Pro	Büchi Labortechnik GmbH, Essen
Fluoreszenzmikroskop IX50	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Fluoroskan Ascent [™] Microplate	Thermo Scientific, Dreieich
Fluorometer	
Gaschromatograph GC-14b	Shimadzu, Kyoto, Japan
Hellfeld-Phasenkontrastmikroskop CKX31	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Inkubator, Hera cell 240	Thermo Scientific, Dreieich
Kryostat-Mikrotom Microm HM 560	Thermo Scientific, Dreieich
Konfokales Laser Scanning Mikroskop LSM 510 Meta	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena
Laborofen, UL 30	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
LumaScope 600	Etaluma Inc., Carlsbad, USA
OPAL-System	Colibri Photonics GmbH, Potsdam
pH-Meter HI 221	Hanna Instruments, Kehl am Rhein

Geräte und Hersteller (Fortsetzung)

Produkt	Hersteller
Präzisionswaage Extend	Sartorius AG, Göttingen
Rheometer MCR 320	Anton Paar GmbH, Ostfildern
Schlauchpumpe IPC ISM 930 C	IDEX Health & Science, Wertheim-Mondfeld
Sicherheitswerkbank, Laminar Flow Hood	Prettl Group, Bempflingen
Sicherheitswerkbank, MSC advantage	Thermo Scientific, Dreieich
Schüttelplattform, Shaker DOS-10M	ELMI Ltd., Riga, Lettland
Schüttelschrank, Centromat® BS-1	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen
Thermostat M3 (Rheometer)	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen
UV-Lampe Rheometer, Delolux 80	DELO Industrie Klebstoffe GmbH & Co KGaA, Windach
UV-Lampe Hydrogele, VL-6L (365 nm)	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell
Vakuumpumpe Laboport	KNF, Trenton, USA
Wasserbad	Memmert GmbH & Co KG, Schwabach
YSI 2700 Select	YSI Incorporated Life Science, Yellow Springs, USA
Zählkammer Neubauer Improved	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Zentrifuge Centrifuge 5720	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Microstar 17	VWR International GmbH, Darmstadt

Tabelle A.2 Materialien und Hersteller

Materialien	Hersteller
Analysensieb, Edelstahl mit Porengröße 100 µm, 200 µm	Augusta Laborbedarf GmbH, Neusäß
CryoPure, 2 mL Gefäße	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Erlenmeyerkolben, 125 mL, 250 mL, 500 mL mit Belüftungskappe	Corning Inc., New York, USA
Gewebekulturflaschen, 75 cm ² , 175 cm ²	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Glaspetrischalen, Ø 15 cm	VWR International GmbH, Darmstadt

Materialien und Hersteller (Fortsetzung)

Materialien	Hersteller
Grace bio-labs silicone gasket	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Mikrotiterplatten, 6, 12, 24, 96 Kavitäten	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Mikrotiterplatten, Costar [®] ultra-low attachment	Corning Inc., New York, USA
Pasteurpipetten, 225 mm	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Polystyrol Rundboden-Röhrchen 5 mL, mit integriertem Zellsieb	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Reaktionsgefäße, 1,5 mL, 2 mL, 5 mL	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht; Eppendorf AG, Hamburg
Serologische Pipetten, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL	Corning Inc., New York, USA
Spinnerflaschen Cellspin, 125 mL	Integra Biosciences GmbH, Konstanz
Spritzen BD Plastikpak [™] Luer-Lock, zentrisch, 10 mL, 20 mL, 50 mL	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Spritzen, Omnican 50 U-100	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterilfilter, Midisart 2000	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Sterilfilter Filtropur L 0,2 µm S	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Sterilfilter Minisart 0,2 µm	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
TissueTek [®] O.C.T. [™] Compound	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen
YSI Membran-Kit Glucose, Lactat	August Kreienbaum GmbH, Warendorf
Zentrifugenröhrchen, 15 mL, 50 mL	Corning Inc., New York, USA
Zellsiebe, Porengröße 100 µm	Corning Inc., New York, USA

A.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle A.3 Chemikalien, Reagenzien und Hersteller

Produkt	Hersteller
αMEM	GIBCO Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Accutase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Chemikalien, Reagenzien und Hersteller (Fortsetzung)

Produkt	Hersteller
Aerosil® R 972	Evonik Industries AG, Essen
Agar	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Agarose	ABGene, Hamburg
Alginat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Alizarinrot S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bodipy	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Calcein-AM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Calciumchlorid Dihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
CellTiter-Blue® Cell Viability Test	Promega GmbH, München
CHOMACS CD	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
CPOx-Partikel	Colibri Photonics GmbH, Potsdam
DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DMEM, 4,5 g/L Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
FF-Hydrogel	Technion, Department of Biomedical Engineering, Haifa, Israel
Fötales Kälberserum (FBS Superior)	Biochrom GmbH, Berlin
Gentamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Hanks' Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Humanserum	C. C. Pro GmbH, Oberdorla
Irgacure® 2959	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kristallviolett	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
L-Glutamin	Biochrom GmbH, Berlin

Chemikalien, Reagenzien und Hersteller (Fortsetzung)

Produkt	Hersteller
Malzextrakt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
MEM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
MOPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumalginat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumcellulosesulfat	Euroferm GmbH, Erlangen
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Neugeborenen Kälberserum	Biochrom GmbH, Berlin
Nonidet-P40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Oil-Red-O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
pDADMAC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PF-Hydrogel	Technion, Department of Biomedical Engineering, Haifa, Israel
Penicillin/Streptomycin	Biochrom GmbH, Berlin
Phalloidin-Atto 488	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PEGDA	Technion, Department of Biomedical Engineering, Haifa, Israel
Propidiumiodid-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
pH-Pufferlösungen	Hamilton GmbH, Martinsried
Safranin O	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe
Silbernitrat-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sojapepton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
StemMACS™ AdipoDiff, ChondroDiff, OsteoDiff Medium	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypsin	Biochrom GmbH, Berlin
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

A.5 Software

Tabelle A.4 Software und Hersteller

Software	Hersteller
Ascent Software v2.6	Thermo Fischer Scientific Inc., Dreieich
cellSens Standard v1.7.1	Olympus Corporation, Tokio
Graphic Analyzer - Mikropartikel	Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover
Graphic Analyzer - CSM	Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover
LumaView v14.2.4	Etaluma Inc., Carlsbad, USA
RheoPlus v3.62	Anton Paar GmbH, Ostfildern
VirtualDub v1.10.4	Avery Lee (Freeware)

B Anhang: Methoden

B.1 Zellkulturtechniken

B.1.1 Revitalisieren der Säugetierzellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden durch Schwenken im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in 4 mL kaltes Kulturmedium überführt und für 5 min bei 200 · g zentrifugiert. Der Überstand, der zelltoxisches DMSO enthält, wurde entfernt und das Zellpellet in insgesamt 15 mL frischem, warmem Kulturmedium suspendiert. Die Suspensionszellen wurden in einem 100 mL Erlenmeyerkolben mit 60 rpm gerührt, während adhärent wachsende Zellen in eine Gewebekulturflasche mit einer Wachstumsoberfläche von 75 cm² überführt wurden. Alle Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert.

B.1.2 Kultivierung und Passage der Säugetierzellen

Die Passage (auch bekannt als Zellsplitting oder Subkultivierung) bezeichnet das Aufteilen von Zellen in mehrere Kulturgefäße und dient dazu, aus den bestehenden Zellen eine große Anzahl von neuen Zellen zu erzeugen. Bei Suspensionszellen (CHO-K1-Zellen) wurde ein Teil der Zellen entnommen und mit frischem Medium in einem weiteren Kulturgefäß (Erlenmeyerkolben, Spinnerflasche) mit einer Animpfdichte von 0,4 Mio. Z/mL kultiviert. Um adhärente Zellen auf mehrere Kulturgefäße zu expandieren, müssen diese zunächst mit einer Enzymlösung von ihrer Wachstumsoberfläche abgelöst werden. Die Passage der Zellen erfolgte, wenn die Oberfläche zu 70 % bis 80 % konfluent bewachsen war. Bei schnell wachsenden Zellen ist dies nach 3-5 Tagen der Fall. Das Kulturmedium wurde abgenommen und die Zellen mit 10 mL warmen 1x PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurde für eine T75-Kulturflasche 2 mL einer Trypsin-EDTA- bzw. Accutase-Lösung hinzugegeben und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Proteasen hydrolysieren Peptidbindungen der EZM und lösen die Zellen von der Kulturoberfläche ab. Durch die Zugabe von 5 mL Kulturmedium wurde die Reaktion gestoppt. Abschließend wurden die Zellen durch Suspendieren vereinzelt und in ein neues Kulturgefäß mit frischem Medium überführt oder für Experimente verwendet. Dazu wurde ein definiertes Volumen für 5 min bei 200 · g zentrifugiert.

B.1.3 Kryokonservierung von Säugetierzellen

Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgte bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ in flüssigem Stickstoff. Die Zellen wurden in Kryomedium, das zu 70 % aus Kulturmedium, 20 % Serum und 10 % DMSO bestand, mit einer Zelldichte von 1 Mio. Z/mL eingefroren. Dazu wurden die Zellen zunächst mit Trypsin oder Accutase abgelöst und für 5 min bei $200\cdot\text{g}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in kaltem Kryomedium aufgenommen und die Zellen vorsichtig suspendiert. Die Kryoröhrchen wurde jeweils mit 1 mL Zellsuspension gefüllt und in einem mit 70 % Isopropanol gefüllten Behältnis (Nalgene[®] Mr. Frosty) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

B.1.4 Isolation der MSC aus Fettgewebe

Die adulten mesenchymalen Stammzellen (MSC) wurden aus dem Fettgewebe einer 44-jährigen Patientin der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) nach einer Abdominoplastik gewonnen. Für die Zellisolation wurde zunächst das Bindegewebe von dem Fettgewebe getrennt und zerkleinert. Anschließend wurde das Fettgewebe mit einer Collagenase-Lösung (0,2 % Collagenase in Hanks' Puffer) versetzt und über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Jedes 50 mL Zentrifugenröhrchen, mit ca. 20 g Gewebe, wurde mit Hanks' Puffer auf 50 mL aufgefüllt und für 5 min bei $150\cdot\text{g}$ zentrifugiert. Der Fettüberstand wurde dekantiert, die mittlere, wässrige Phase wurde abgenommen und das verbliebene Pellet mit dem Fettüberstand vereinigt und erneut mit Hanks' Puffer auf 50 mL aufgefüllt. Die Suspension wurde für 10 min bei $550\cdot\text{g}$ zentrifugiert. Der Fettüberstand wurde abgenommen und das Pellet in Hanks' Puffer aufgenommen und 10 min bei $550\cdot\text{g}$ zentrifugiert. Abschließend wurde der wässrige Überstand abgenommen und das Pellet in Kulturmedium suspendiert. Die Suspension wurde in Gewebekulturflaschen (175 cm^2) gegeben und inkubiert. Um Rückstände des Bindegewebes zu entfernen, wurde das Medium nach 24 h gewechselt.

B.2 Chemische Synthese der Fibrinogen-basierten Hydrogele

Wie in Abschnitt 3.2.2 erläutert, wurden beide Fibrinogen-basierten Hydrogele in einer zwei-stufigen chemischen Synthese nach einem identischen Reaktionsmechanismus hergestellt. Im Folgenden ist die Synthese des PF-Hydrogels beschrieben.

Synthese von PEG-Diacrylat (PEGDA)

1. PEG-Diacrylat (PEGDA) wurde aus PEG (10 kDa, mol wt 8500-11500) synthetisiert. 60 g PEG (10 mmol) wurden durch eine azeotrope Destillation mittels Dean-Stark-Apparatur in 600 mL DCM:Toluol für 1 h getrocknet, um im PEG enthaltendes Wasser abzuschneiden. Damit keine Feuchtigkeit kondensiert, wurde dies unter Argonatmosphäre durchgeführt.

2. Spätestens nachdem die Apparatur auf 50 °C gekühlt war, wurde unter Argonatmosphäre TEA (12,3 mL, 4,4 eq.) hinzugegeben.
3. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Acryloylchlorid (6,74 mL Gesamtvolumen, 4,0 eq.), das in zwei Teilen im Abstand von 10 min zugegeben wurde, eingeleitet und über Nacht lichtgeschützt bei RT unter Argonatmosphäre weitergeführt.
4. Um Schwebstoffe und Salze vom Produkt zu entfernen, wurde die schwach gelbe Lösung durch neutrales Alumina (Aluminiumoxid) gefiltert. Anschließend wurde der Toluollösung zum Neutralisieren Natriumcarbonat hinzugegeben und die Lösung für weitere 2 h gerührt. Natriumcarbonat bindet nicht umgesetztes PEG als TEA-Salz, das zusammen mit überschüssigem Natriumcarbonat durch Filtration abgetrennt wurde. Anschließend wurde DCM:Toluol im Vakuum eingeeengt.
5. Das Produkt wurde mit einem kleinen Volumen Dichlormethan gelöst und durch tropfenweise Zugabe von eiskaltem Diethylether im Eisbad gefällt. Nach der Gewinnung durch Filtration wurde das Präzipitat mit eiskaltem Diethylether gewaschen und im Vakuum für 48 h getrocknet. Das Produkt, PEG-Diacrylat, ist ein weißes kristallines Pulver.
6. Das Produkt wurde zur Qualitätskontrolle mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie (200 MHz) in DMSO charakterisiert. Dadurch kann ebenfalls die durchschnittliche Anzahl an Acrylgruppen eines PEG-Moleküls bestimmt werden. 3,5 ppm (264.74 H, PEG), 4,2 ppm (t, 2.51 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,9 ppm (dd, 1.00 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COO}-$), 6,1 ppm, 6,4 ppm (dd, 2.17 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COO}-$).

Konjugation von Fibrinogen an PEGDA

1. Fibrinogen wurde an PEGDA mittels Michael-Addition konjugiert. Dazu wurde eine 3,5 mg/mL Fibrinogen-Lösung in PBS (150 mM) mit 8 M Harnstoff pH = 7,4 hergestellt und für 3 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Die Fibrinogen-Lösung wurde aus lyophilisiertem 70 % Fibrinogen hergestellt.
2. Ergänzt wurde die Lösung durch die Zugabe von (TECP · HCl) in einem molaren Verhältnis von 1,5:1 TCEP zu Fibrinogen. Die Lösung wurde unter Rühren vollständig gelöst. TCEP ist ein Reduktionsmittel und bricht die Disulfidbindungen des Fibrinogens, so dass aktivierte Thiolgruppen entstehen. Nach Zugabe von TCEP wurde die Lösung sauer. Daher wurde der pH-Wert mit 0,5 M bis 6 M NaOH auf pH = 8 eingestellt.
3. Anschließend wurde die Konjugationsreaktion durch Zugabe der Polymerlösung gestartet. Dazu wurden zunächst 280 mg/mL PEGDA in PBS mit 8 M Harnstoff gelöst und in einem molaren Verhältnis von 4:1 PEGDA zu Fibrinogen zu der Fibrinogen-Lösung hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 3 h unter Rühren bei RT durchgeführt. Da das Polymer lichtempfindlich ist, wurde das Reaktionsgefäß mit Aluminiumfolie vor Licht

geschützt. Die Reaktion wurde mit dem doppelten Volumen an PBS mit 8 M Harnstoff gestoppt.

4. Das konjugierte Protein wurde durch die Zugabe des 4-fachen Volumen an Aceton gefällt. Dazu wurde ein 1000 mL Scheidetrichter mit 400 mL Aceton und der Polymerlösung gefüllt, geschüttelt und anschließend das Produkt gefällt. Überschüssiges PEGDA blieb in Aceton gelöst. Das Produkt wird für 2 min bei 1560 rpm zentrifugiert. Der acetonhaltige Überstand wurde abgenommen und die Polymerlösung nochmals für 2 min bei 1560 rpm zentrifugiert.
5. Das Präzipitat wurde nun in PBS mit 8 M Harnstoff (2,2 mL/g Produkt) gelöst, so dass eine Fibrinogenkonzentration von 10 mg/mL vorlag. Das Produkt wurde mittels Ultra-Turrax® T-25 ca. 10 s homogenisiert. Das homogenisierte Hydrogel wurde so lange für 3 min bei 1560 rpm zentrifugiert, bis das Hydrogel transparent vorlag.

Aufreinigung des PF-Hydrogels mittels Dialyse

1. Die Aufreinigung des Hydrogels ist notwendig um toxische Moleküle, wie zum Beispiel zellschädigenden Harnstoff, zu eliminieren. Die Größe der Dialysemembran wurde so gewählt, dass das Produkt nicht durch die Membran diffundiert und in der Dialysemembran zurückbleibt (Spectra/Por® 2, MWCO 10 kDa bis 14 kDa). Für die Dialyse wurde ein 5 L Gefäß mit 4 L 1x PBS verwendet. Das Hydrogel wurde für 48 h bei 4 °C dialysiert, wobei jeweils zwei PBS-Wechsel pro Tag durchgeführt wurden.
2. Die Membran wurde zunächst in PBS mit 8 M Harnstoff eingelegt und anschließend mit dem hergestellten Hydrogel gefüllt, verschlossen und in den vorbereiteten Dialysebehälter gelegt. Der erste PBS-Wechsel wurde bereits nach 4 h bis 6 h durchgeführt. Abschließend wurde das Hydrogel steril unter der Sterilbank aus der Dialysemembran entnommen und in ein steriles Gefäß überführt und ggf. aliquotiert.

B.3 Herstellung und Kultivierung von Hydrogel-Mikropartikeln

Die Verkapselung von Zellen in Mikropartikeln und Mikrokapselfn erfolgte mittels Encapsulator B-395 Pro (Büchi Labortechnik GmbH). Der Aufbau und die Funktionsweise wurden in Abschnitt 4.1 detailliert beschrieben.

B.3.1 Partikel mit Hefezellen

Für die Kultivierungsexperimente wurde eine definierte Zellmenge aus einer Vorkultur in der exponentiellen Wachstumsphase entnommen und mit einer sterilfiltrierten 1,5 % Na-Alginatlösung durch Rühren suspendiert. Die Suspension wurde mit einer 60 mL Einweg-

spritze an der Pulschammer des Encapsulators angebracht. Für die Herstellung von Core-Shell-Mikrokapseln wurde zusätzlich eine zellfreie sterilfiltrierte 1,5 % Na-Alginatlösung über die Druckflasche an der Pulschammer angeschlossen. Die Partikel wurden für 5 min im Härtingsbad (100 mM CaCl₂-Lösung mit 10 mM MOPS) ausgehärtet. Anschließend wurden die Partikel in einem Zellsieb dreimal mit MOPS-Puffer gewaschen. Ein definiertes Volumen an Mikropartikeln bzw. Mikrokapseln (Abbildung B.5) wurde in einen 250 mL Erlenmeyerkolben überführt und mit 100 mL Kulturmedium versetzt. Die Partikel wurden bei 28 °C und 150 rpm kultiviert.

B.3.2 Partikel mit Säugetierzellen

Die Säugetierzellen (Hep-G2, MSC) wurden zunächst in einem flüssigen Hydrogel (NaCS, Alginat-PF- oder Alginat-FF-Hydrogel) suspendiert und die zellhaltige Polymerlösung mittels Encapsulator in das Härtingsbad vertropft. Zum Aushärten wurden die Mikropartikel bzw. Mikrokapseln für 5 min unter Rühren inkubiert. Anschließend wurden die Partikel in einem Zellsieb dreimal mit MOPS-Puffer gewaschen, in ein Kultivierungsgefäß (Spinnerflasche (25 rpm), Zellkulturplatte) überführt und mit Kulturmedium versetzt. Die verkapselten Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert.

B.4 Solide 3D Hydrogelkonstrukte für die Kultivierung tierischer Zellen

Aufgrund der chemischen Synthese schwankt die Fibrinogenkonzentration unterschiedlicher Hydrogelchargen zwischen 8 mg/mL und 13 mg/mL. Daher wurde die Zusammensetzung des Hydrogels für die Kultivierung tierischer Zellen auf eine Fibrinogenkonzentration von 8,0 mg/mL eingestellt. Für die Mixtur wurde das Hydrogel in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 1 % Photoinitiator-Lösung versetzt. Optional wurde dem Ansatz, je nach Experiment, 0 % bis 2 % PEGDA-Lösung hinzugegeben und das Gemisch mit PBS auf eine Fibrinogenkonzentration von 8,0 mg/mL eingestellt. Die Hydrogellösung wurde vorsichtig suspendiert, dass keine Luftblasen entstanden und zeitnah weiterverarbeitet.

Für die Herstellung solider 3D Hydrogelkonstrukte wurden Silikonslides mit runden, 6 mm großen Kavitäten verwendet (Grace Bio-Labs silicone gasket), die mittels UV-Licht in Petrischalen aus Polystyrol sterilisiert wurden. Um adhärente Zellen in Hydrogelen verkapseln zu können, wurden diese zunächst aus einer Gewebekulturflasche abgelöst. 1 Mio. Zellen wurden in einem 2 mL Reaktionsgefäß für 5 min bei 200 · g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 mL Hydrogel (inkl. Photoinitiator und PEGDA) resuspendiert. Jeweils 50 µL der flüssigen Hydrogel-Zellsuspension wurden in eine Kavität des Silikonslides überführt und im Abstand von 2 cm für 2 min mit UV-Licht polymerisiert. Anschließend wurden die soliden 3D Hydrogelkonstrukte in Kulturmedium in Zellkulturplatten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

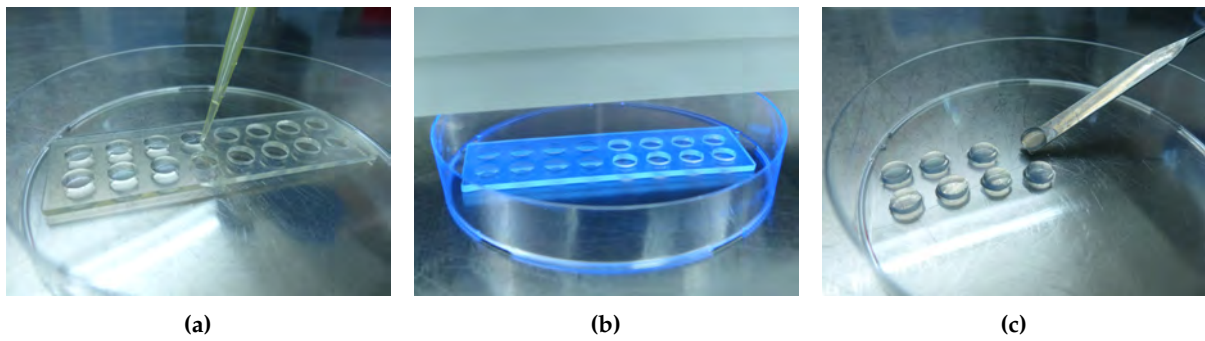


Abbildung B.1 Herstellung solider Hydrogelkonstrukte: (a) Füllen der Silikonplatten mit flüssigem Hydrogel, (b) Polymerisation mittels UV-Licht und (c) Umsiedeln der soliden Hydrogelkonstrukte in Medium.

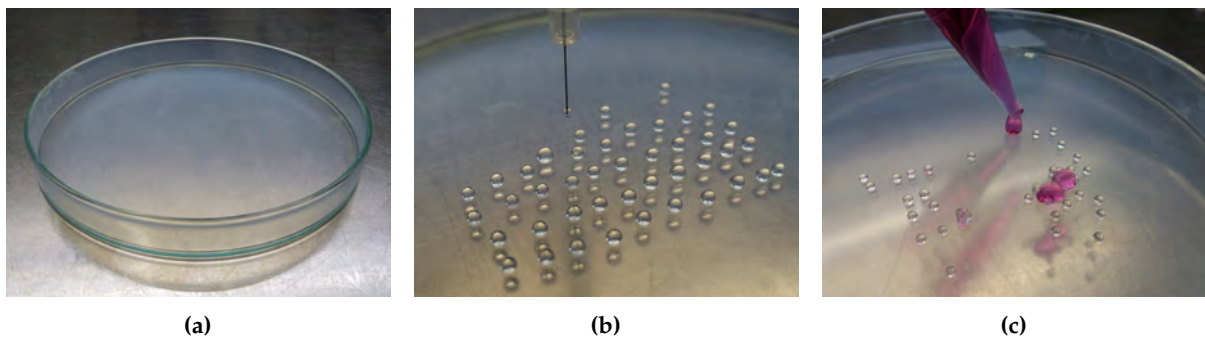


Abbildung B.2 Herstellung solider Hydrogel-Makropartikel: (a) Glaspetrischale mit einer homogenen, superhydrophoben Oberflächenbeschichtung, (b) Hydrogel-Makropartikel werden auf der Oberfläche positioniert und (c) polymerisierte Makropartikel werden mit Kulturmedium abgespült und kultiviert.

Die einzelnen Schritte zur Herstellung solider Hydrogelkonstrukte sind in Abbildung B.1 dargestellt.

Um kleinere 3D Hydrogelkonstrukte (Makropartikel) aus den Fibrinogen-basierten Hydrogelen herzustellen, wurde das flüssige Hydrogel mit einer Insulinspritze auf eine superhydrophobe Oberfläche vertropft. Die Makropartikel wurden für 1 min mit UV-Licht polymerisiert. Die soliden Makropartikel wurden mit Kulturmedium abgespült und in Kultivierungsgefäßen wie zum Beispiel Zellkulturplatten oder Spinnerflaschen überführt und kultiviert. Die Herstellung der Hydrogel-Makropartikel ist in Abbildung B.2 gezeigt.

Superhydrophobe Oberfläche Die Oberflächenbeschichtung zur Herstellung der Hydrogel-Makropartikel wurde mittels Spray-Coating-Verfahren hergestellt. Dazu wurden Glaspetrischalen mit einem Durchmesser von 15 cm mit 70 % EtOH gereinigt und auf 150 °C erwärmt. Eine Aerosil® R 972/EtOH-Suspension mit einer Konzentration von 10 g/L wurde in dünnen Schichten gleichmäßig mit einer Airbrushpistole auf die Glasoberfläche aufgetragen. Um die Oberfläche zu trocknen, wurde die Petrischale auf 150 °C erhitzt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Zur Sterilisation wurden die Petrischalen unter der Sterilwerkbank für 8 h mit UV-Licht bestrahlt.

B.4.1 Zelldifferenzierung

Um die Leistungsfähigkeit der MSC zur Zelldifferenzierung in 3D Hydrogelkonstrukten zu beurteilen, wurden 1 Mio. Z/mL Hydrogel suspendiert und solide Hydrogelkonstrukte mit einem Volumen von 50 μ L hergestellt (Abschnitt B.4). Die Hydrogelkonstrukte wurden in speziellen Kultivierungseinsätzen kultiviert, um den Austausch des Kulturmediums zu erleichtern (Abb. B.3a). Es wurde jeweils ein Hydrogelkonstrukt pro Einsatz in einer Kavität einer Zellkulturplatte mit insgesamt 12 Kavitäten in 2 mL Kulturmedium für 4 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zelldifferenzierung in Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten wurde durch entsprechendes Differenzierungsmedium induziert und über 21 Tage durchgeführt (Abb. B.3b). Dabei wurde das Medium alle 4 Tage durch frisches Differenzierungsmedium ausgetauscht. Die Kontrollen wurden analog in α MEM-Flüssigmedium mit 10 % HS kultiviert. Von den Hydrogelkonstrukten wurden, wie in Abschnitt B.6.6 beschrieben, histologische Schnitte angefertigt und anschließend gefärbt.

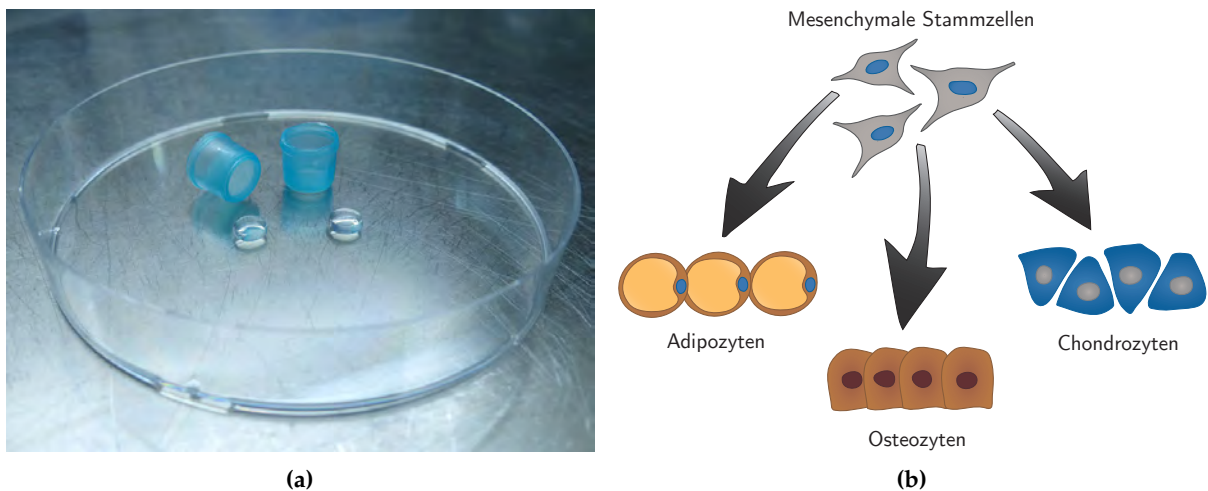


Abbildung B.3 (a) Kultivierungseinsätze (blau) für Zellkulturplatten und solide Hydrogelkonstrukte. (b) Schematische Darstellung möglicher Zelldifferenzierungen mesenchymaler Stammzellen.

B.5 3D Sphäroidkulturen

Die Sphäroidkulturen wurden mittels Hanging-Drop-Methode oder Zellkulturplatten (Costar[®] ultra-low attachment) hergestellt (Abschnitt 4.4.3). Bei der Hanging-Drop-Methode werden Zellen in einem hängenden Tropfen kultiviert, so dass die Zellen keinen Kontakt zur Plastikoberfläche aufweisen. Dadurch haben die Zellen nur die Möglichkeit Bindungen zu Nachbarzellen einzugehen und bilden ein Zellaggregat bzw. Zellsphäroid. Die Zellkulturplatten weisen hingegen eine spezielle Beschichtung auf, die die Adhäsion der Zellen auf dem Plattenboden verhindert. Für die Sphäroidkulturen wurde eine Zellkonzentration von 0,1 Mio. Z/mL Medium verwendet.

B.6 Analytische Methoden

B.6.1 Rheologische Messungen

Die mechanischen Eigenschaften der Hydrogele wurden mit einem Oszillations- und Rotationsrheometer MCR 302 (Anton Paar GmbH) analysiert. Der Aufbau und das Funktionsprinzip des Rheometers werden in Abschnitt 4.2.1 erläutert. In Tabelle B.1 sind die technischen Daten der einzelnen Module zusammengefasst und in Abbildung B.4 ist die Intensität der UV-Lampe Delolux 80 bei unterschiedlichen Amplituden gezeigt.

Tabelle B.1 Technische Daten des Rheometer MCR 302

Modul	Bezeichnung/Bereich
Peltier-Element	P-PTD 200
Temperaturbereich	−40 °C bis 200 °C
Heiz-/ Kühlrate	60 K/min, 50 K/min
UV-Aushärtungssystem	P-PTD 200/GL
UV-Lichtquelle	Delolux 80, LED-Lampe
Wellenlänge	365 nm
Intensität	> 1000 mW/cm ²
Gesamtlichtleistung	> 3 W
Abstand UV-Lampe zur Platte	3 cm
Messgeometrie	Platte-Platte
Probenvolumen	400 µm (Ø 20 mm), 1,8 mL (Ø 40 mm)
Messspalt	1 mm

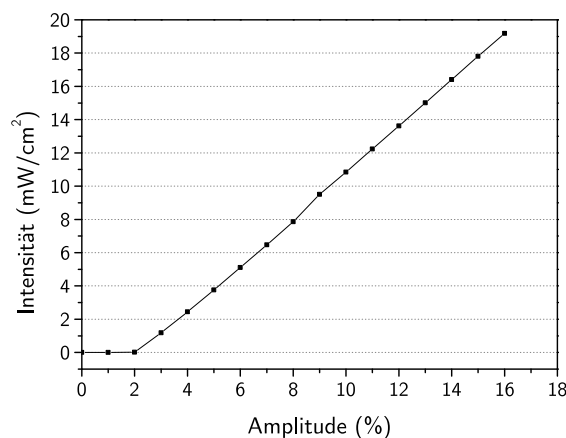


Abbildung B.4 Intensitäten der UV-Lampe Delolux 80 bei verschiedenen Amplituden.

B.6.2 Zellzahlbestimmung

Zellen in Suspension Die Zelldichte (Zellen/mL) wurde manuell mithilfe einer Neubauer Improved Zählkammer, oder automatisiert mit einem elektronischen Zellzähler (Cedex AS20 bzw. Cellometer[®] Auto T4) ermittelt.

Bei der Neubauer-Zählkammer handelt es sich um einen speziellen Objektträger, auf dem quadratische Felder definierter Größe eingätzt sind. Das Volumen pro Großquadrat beträgt $0,1 \text{ mm}^3$. Zur Bestimmung der Zellzahl wird ein Deckgläschen auf der Zählkammer fixiert und jeweils $10 \text{ }\mu\text{L}$ Zellsuspension auf den Mittelsteg pipettiert. Durch Kapillarkräfte wird die Suspension in den Zählraum gezogen. Anschließend werden die Zellen aller vier Großquadrate, die jeweils in 16 Quadrate unterteilt sind, mäanderförmig gezählt und der Mittelwert der Großquadrate berechnet. Dieser Wert wird mit dem Volumenfaktor eines Großquadrates (10^4) multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter zu ermitteln.

Bei den elektronischen Zellzählssystemen handelt es sich um ein optisch-basiertes Verfahren, bei dem die Zellsuspension in spezielle Zählchips ($20 \text{ }\mu\text{L}$) oder Zählgefäße (1 mL) gefüllt wird. Mit einer integrierten Kamera werden digitale Bilder aufgenommen, gespeichert und mit einer Software automatisch ausgewertet. Es wird die Gesamtzellzahl sowie bei einer Färbung mit Trypanblau die Lebendzellzahl sowie die Viabilität der Zellen in Prozent bestimmt.

Zellen in Partikeln Zur Bestimmung der Zellzahl innerhalb der Mikropartikel bzw. Mikrokapseln wurde ein definiertes Volumen an Partikeln aus der Kultur entnommen (Abb. B.5). Um mögliche Suspensionszellen zu entfernen und die Partikel zu verdichten, wurden diese zweimal mit MOPS-Puffer gewaschen. Die Partikel wurden mit 5 mL Natriumcitrat-Lösung aufgelöst und die Zellen für 5 min bei $400 \cdot g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in PBS gelöst und die Gesamtzellzahl mittels elektronischem Zellzähler bestimmt (Abschnitt B.6.2).

Die durchschnittliche Zellzahl pro Partikel wurde über die Partikelanzahl berechnet. Dazu wurde zunächst das mittlere Partikelvolumen mit Hilfe des Partikeldurchmessers (Abschnitt 4.1.2) bestimmt. Da ein definiertes Partikelvolumen aufgelöst wurde, konnte unter Berücksichtigung einer kubisch flächenzentrierten Anordnung der Partikel (dichteste Kugelpackung) die Anzahl der aufgelösten Partikel berechnet werden. Mithilfe der Partikelanzahl und der Gesamtzellzahl konnte die durchschnittliche Zellzahl pro Partikel bestimmt werden.

Die Methode zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde in einer separaten Kultivierung mit Core-Shell-Mikrokapseln validiert. Dazu wurden mittels Zellsieb (Abb. B.5) nach 15 h, 21 h und 27 h jeweils drei Proben entnommen und die Gesamtzellzahl durch eine Mehrfachanalyse bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung B.5b dargestellt. Zu allen Kultivierungszeitpunkten konnte eine Standardabweichung $< 5 \%$ ermittelt werden. Daher wurde zur Bestimmung der Zellzahl in den Partikeln bei den Kultivierungen (Abschnitt 4.3) jeweils nur eine Probe entnommen und einer Mehrfachbestimmung unterzogen.

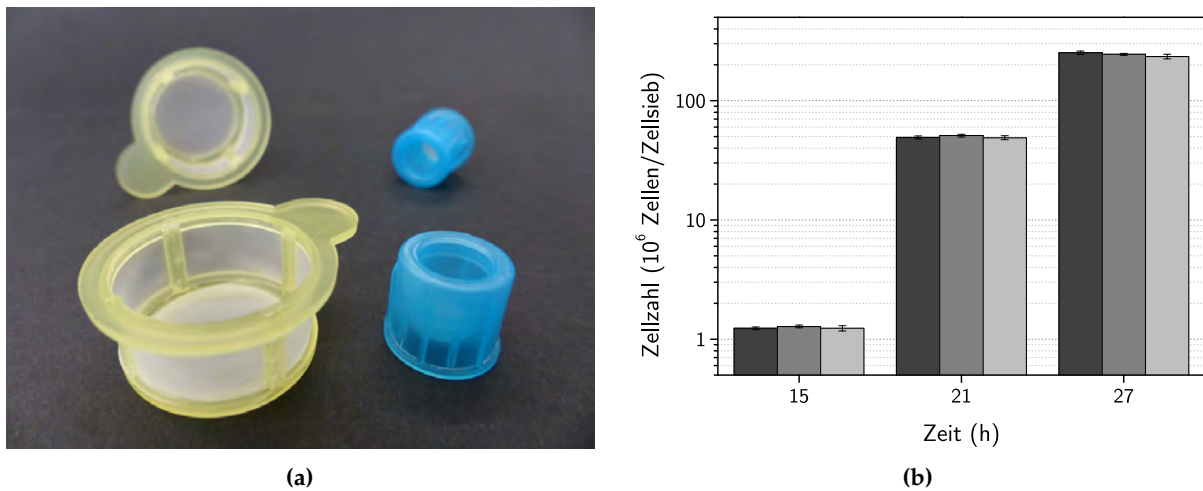


Abbildung B.5 (a) Zellsiebe zur Bestimmung einer definierten Anzahl an Mikropartikeln: Gelbes Zellsieb (Porengröße $100\ \mu\text{m}$, $V = 3,77\ \text{cm}^3$) für das Inokulieren einer Kultivierung und blaues Zellsieb (Porengröße $100\ \mu\text{m}$, $V = 0,785\ \text{cm}^3$) für die Probennahme zur Zellzahlbestimmung. (b) Validierung der Methode zur Bestimmung der Zellzahl in den Partikeln ($\text{SD} < 5\%$).

B.6.3 Medienanalytik

Glucose- und Lactat Die Bestimmung der Glucose- und Lactatkonzentration stellt in der Zellkulturtechnik eine wichtige Analyse dar. Glucose ist eine bedeutende Energiequelle für tierische Zellen, während Lactat ein Stoffwechselprodukt darstellt. Die Messungen erfolgten mit einem biochemischen Analysator YSI 2700 (YSI Incorporated Life Science, Yellow Springs, USA) nach einer enzymatisch-amperometrischen Methode. Durch die enzymatische Umsetzung des Substrates entsteht Wasserstoffperoxid, das durch eine Celluloseacetatmembran diffundiert. An einer Platinelektrode zerfällt das Wasserstoffperoxid zu zwei Protonen, Sauerstoff und zwei Elektronen. Der dabei entstehende Strom ist proportional zur Konzentration des Substrates. Alle Proben wurden für 5 min bei $13\ 000 \cdot g$ zentrifugiert und einer Dreifachbestimmung unterzogen.

Ethanol Die Bestimmung der Ethanolkonzentration erfolgte mittels Gaschromatographie. Die Kalibrierung wurde als zwei-Punkt-Kalibration mit Ethanolkonzentrationen von $1\ \text{g/L}$ und $10\ \text{g/L}$ durchgeführt. Zur Messung der Proben wurden diese zunächst für 5 min bei $13\ 000 \cdot g$ zentrifugiert und 1:10 mit n-Propanol als internen Standard verdünnt ($90\ \mu\text{L}$ Probe, $10\ \mu\text{L}$ n-Propanol ($8\ \text{g/L}$)). Alle Proben wurden einer Dreifachbestimmung unterzogen. Die technischen Daten des Gaschromatographen sowie weitere Parameter sind in Tabelle B.2 zusammengefasst.

B.6.4 Fixierung der Zellen

Durch die Fixierung der Zellen werden alle Stoffwechselwege und Signalkaskaden einer Zelle gestoppt und zelluläre Proteine und Strukturen konserviert. Hydrogelkonstrukte können somit

Tabelle B.2 Technische Daten des Gaschromatographen

Technische Parameter	Bezeichnung/Einstellung
Gaschromatograph	Shimadzu, GC-14b
Säule	Chromosorb 101,80/100 6' · 18
Säulentemperatur	160 °C
Detektor	FID
Laufzeit pro Probe	2,5 min
Injektionsvolumen	0,5 µL

über mehrere Wochen bei 4 °C in PBS gelagert werden, ohne dass die Zellmorphologie und netzartigen Zellstrukturen durch Anschwellen oder Schrumpfen zerstört werden.

Bevor die Zellen in Hydrogelkonstrukten fixiert werden konnten, wurden diese zunächst zweimal für 5 min bei 37 °C mit PBS gewaschen. Dadurch konnten die Konstrukte, die durch das im Kulturmedium enthaltene Phenolrot rot gefärbt waren, vollständig entfärbt werden. Anschließend wurden die Hydrogele in einer 4 % PFA-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Um die Zellen zu permeabilisieren wurden die Konstrukte für 10 min mit einer Triton X-100-Lösung (0,3 % in PBS) bei Raumtemperatur solubilisiert. Vor der Färbung mit Phalloidin-DAPI oder der Herstellung von Mikrotomschnitten, wurden die Hydrogelkonstrukten zweimal für 5 min mit PBS gewaschen.

B.6.5 Zellfärbungen

Calcein-AM und Propidiumiodid Die Zellfärbung mittels Calcein-AM und Propidiumiodid dient zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Calcein-AM passiert die Zellmembran und wird im Zytosol durch Esterasen gespalten. Der entstandene Alkohol (Calcein) bindet mit den Eisenionen des Zytosols einen fluoreszierenden nicht membrangängigen Komplex. Die grün fluoreszierenden Zellen können unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem U-MNB-Filter (470 nm bis 490 nm) betrachtet werden. Propidiumiodid kann intakte Zellmembranen hingegen nicht passieren und bindet an Nukleinsäuren nekrotischer Zellen. Die Zellen weisen unter dem Fluoreszenzmikroskop eine rot-orange Färbung auf und können mittels U-MNG Filter (530 nm bis 550 nm) betrachtet werden.

Für die Färbung solider 3D Hydrogelkonstrukte wurden diese in einem 2 mL Reaktionsgefäß überführt, das mit PBS aufgefüllt wurde. Aufgrund der Sedimentation der Konstrukte konnte der Überstand abgenommen werden. Die Hydrogelkonstrukte wurden zweimal für 5 min bei 37 °C mit PBS gewaschen, so dass die Konstrukte vollständig entfärbt waren. Aus den Calcein-AM- und Propidiumiodid-Stammlösungen wurde eine Färbelösung mit einer Konzentration von 3 µM Calcein-AM und 2,5 µM Propidiumiodid in Flüssigmedium ohne Zusätze hergestellt, mit der die Hydrogele überschichtet und für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurden.

Um das Hintergrundsignal zu reduzieren, wurden die Hydrogelkonstrukte dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Phalloidin-DAPI Die Färbung mittels Phalloidin-Atto 488 und DAPI ermöglicht es, die Zellstrukturen und Zellkerne zu färben und somit die Morphologie der Zellen zu untersuchen. Phalloidin weist eine hohe Affinität zu filamentösem Aktin (F-Aktin) auf, während DAPI mit doppelsträngiger DNA interkaliert und Komplexe ausbildet. Die mit Phalloidin gefärbten Zellen sind mittels Fluoreszenzmikroskop mit einem U-MNB-Filter (470 nm bis 490 nm) zu erkennen, und die DAPI-Färbung wird mit einem U-MWU Filter (330 nm bis 385 nm) sichtbar. Um die Zellmorphologie im Detail abzubilden, wurden jedoch hochauflösende Bilder mit einem Laser-Konfokalmikroskop (LSM 510 Meta) erstellt. Dazu wurde Phalloidin mit einem Argon-Laser (488 nm) und DAPI mit einem Diodenlaser (405 nm) angeregt, wobei ein Langpassfilter ab 505 nm bzw. 420 nm verwendet wurde.

Zunächst wurden Zellen in den Hydrogelkonstrukten, wie in Abschnitt B.6.4 beschrieben, fixiert. Die Hydrogele wurden mit einer Phalloidin-Färbelösung, die aus der Phalloidin-Stammlösung hergestellt wurde (Verdünnung 1:1000 in PBS), für 60 min inkubiert und anschließend zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Danach wurden die Hydrogelkonstrukte mit einer DAPI-Färbelösung, die aus einer DAPI-Stammlösung hergestellt wurde (Verdünnung 1:100 in DAPI-Puffer), für 10 min inkubiert. Um das Hintergrundsignal zu reduzieren, wurden die Hydrogele abschließend zweimal für 5 min mit PBS gewaschen.

B.6.6 Histologie

Zur Untersuchung der Gewebestrukturen und Zelldifferenzierung wurden von den Hydrogelkonstrukten histologische Schnitte angefertigt. Hierzu wurden die Zellen, wie in Abschnitt B.6.4 beschrieben, fixiert. Die 3D Konstrukte wurden in flüssigem TissueTek[®] eingebettet und bei -20°C eingefroren. Von den eingefrorenen Hydrogelkonstrukten wurden mit einem Gefriermikrotom (Mikrom HM 560) Schnitte mit einer Dicke von 20 μm bzw. 50 μm hergestellt. Diese wurden auf einen Objektträger überführt und mit eiskaltem 70 % Ethanol fixiert. Die Präparate wurden bis zur Färbung bei -20°C gelagert und jeweils zweimal vor und nach der Inkubation mit der Farbstofflösung mit PBS gewaschen.

Kristallviolett-Färbung Kristallviolett ist ein violetter Triphenylmethanfarbstoff, der die Zellen irreversibel färbt. Dazu wurden die histologischen Schnitte für 10 min mit einer 0,1 % Kristallviolett-Lösung gefärbt. Die Betrachtung erfolgte unter dem Phasenkontrastmikroskop.

Bodipy-Färbung Die intrazellulären Lipidvesikel wurden durch Bodipy 493/503 (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen) visualisiert. Bodipy bindet spezifisch an

Triglyceride der Lipide ohne eine unspezifische Bindung zu Lipiden der Zellmembran. Die Mikrotomschnitte wurden mit 1 mL Bodipy-Lösung (5 μ M in PBS) für 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Fluoreszenz des gebundenen Bodipy wurde bei einer Exzitations- bzw. Emissionswellenlänge von 480 nm und 530 nm detektiert.

Oil-Red-O-Färbung Oil-Red-O ist ein fettlöslicher, rot färbender Azofarbstoff, der wie Bodipy, die Triglyceride anfärbt. Das Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 518 nm sowie 359 nm. Die Färbungen können mittels Phasenkontrastmikroskop betrachtet werden. Die Präparate wurden mit einer Arbeitslösung (150 μ L in 100 μ L dH₂O) aus einer Stammlösung (300 mg in 100 mL dH₂O) für 20 min bei Raumtemperatur gefärbt.

Safranin-O-Färbung Safranin O (3,7-Diamino-2,8-dimethyl-5-phenyl-phenaziniumchlorid) ist ein Farbstoff der Safranine und weist eine dunkelrot-violette Färbung auf. Der Farbstoff bindet an saure Proteoglykane, die vermehrt von Chondrozyten gebildet werden. Die fixierten Mikrotomschnitte wurden mit 1 mL Safranin-O-Lösung (20 mg in 20 mL dH₂O) für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Von-Kossa-Färbung Zur Beurteilung des osteogenen Differenzierungsprozesses wurde eine von-Kossa-Färbung durchgeführt. Dazu wurden die Präparate zweimal mit kaltem dH₂O gewaschen und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln in 1 mL 5 % Silbernitratlösung in dH₂O inkubiert. Anschließend wurden die histologischen Schnitte zweimal mit dH₂O gewaschen und für weitere 2 min in 1 mL Formaldehyd-Lösung (5 % Dinatriumcarbonat + 0,2 % Formaldehyd in dH₂O) inkubiert. Es ist eine indirekte Färbung, die mit den anionischen Bestandteilen der Calciumverbindungen, wie beispielsweise Carbonaten und Phosphaten, reagiert. Diese werden gegen Silberionen ausgetauscht und zu metallischem Silber reduziert, das unter dem Mikroskop eine schwarzbraune Färbung aufweist.

Alizarinrot-Färbung Die Färbung mittels Alizarinrot (1,2-dihydroxy-anthrachinon) wurde für den histochemischen Calciumnachweis durchgeführt. Der Farbstoff bildet mit dem vorhandenen Calcium einen Chelatkomplex, der eine intensive rote Färbung aufweist. Die Präparate wurden für 15 min mit einer 2 % Alizarinrot-Lösung in EtOH (pH = 4,5) bei Raumtemperatur inkubiert.

B.6.7 CellTiter-Blue[®] Proliferationstest

Zum Nachweis der Zellproliferation in soliden Hydrogelkonstrukten (Volumen: 50 μ L) wurde der CellTiter-Blue[®] Test an das 3D System angepasst. Das Reagenz enthält den blauen Farbstoff Resazurin, der von lebenden Zellen zu dem pinkfarbenen Resorufin umgesetzt wird und Licht bei einer Wellenlänge von 590 nm emittiert. Somit ist das Fluoreszenzsignal

proportional zur Zellzahl. Um das Wachstum der Zellen auf der zweidimensionalen Wachs-
tumsoberfläche zu verhindern, wurden die Zellkulturplatten (24 Kavitäten) zuvor mit einer
dünnen Schicht Agarose beschichtet. Für den Proliferationstest wurde jeweils ein solides Hy-
drogelkonstrukt mit 1 Mio. Z./mL Hydrogel in einer Kavität in 1 mL Kulturmedium für 7 Tage
kultiviert (Abschnitt B.4). Messungen wurden nach 0, 1, 4 und 7 Tagen mit jeweils drei Kavitäten
durchgeführt. Dafür wurden 100 µL Medium pro Kavität für die Bestimmung der Glucose-
und Lactatkonzentrationen entnommen. Pro Kavität wurden 100 µL CTB-Reagenz (Verhältnis
1:10) hinzugegeben und die Zellen für 5 h bei 37 °C inkubiert. Zur Bestimmung der relativen
Fluoreszenz (RFU) wurden jeweils 100 µL der CTB-Medium-Lösung in eine Zellkulturplatte
(96 Kavitäten) überführt und mittels Fluorometer (Fluoroskan Ascent™) analysiert. Zur Norma-
lisierung der Daten wurde ein zellfreies Hydrogelkonstrukt herangezogen. Von jeder Kavität
und der CTB-Medium-Lösung wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

B.7 Zeitrafferaufnahmen

Die Zeitrafferaufnahmen wurden mittels Mikroskop LumaScope 600 (Etaluma, Inc.) erstellt
(Abb. B.6a). Das Mikroskop wurde speziell für die Aufnahme von Zellkulturen im Inkubator
konzipiert und verfügt neben einer weißen Lichtquelle (Hellfeld) auch über drei verschiedene
Fluoreszenzen.

Mit der Software ist es möglich, sowohl Einzelbilder als auch Bilder in festgelegten Zeitinter-
vallen aufzunehmen, woraus Zeitrafferfilme erzeugt werden können. Dabei entstehen in der
Regel große Datenmengen, die verarbeitet werden müssen. Das Zeitintervall betrug, abhängig
von der Kultivierungsdauer, zwischen 1 min und 5 min. Die Spezifikationen des Mikroskops
sind in Tabelle B.3 dargestellt.

Tabelle B.3 Technische Daten des LumaScope 600

Spezifikation	Eigenschaften/Bereich
Objektive (Arbeitsbereiche)	4x (17,5 mm), 10x (8,6 mm), 20x (0,7 mm)
Lichtquellen	weiß (Hellfeld), violett 405 nm, blau 488 nm, orange 589 nm (Fluoreszenz)
Excitations- und Emissionsfilter	Kanal 1: Excitation 370-410 nm; Emission: 429-462 nm Kanal 2: Excitation 473-491 nm; Emission: 502-561 nm Kanal 3: Excitation 580-598 nm; Emission: 612-680 nm
Kamera	CMOS-Sensor (2x2 µm/Pixel), 1944x1944 Pixel (3,8 MP)
Größe, Gewicht	23 cm (B) x 13 cm (T) x 12 cm (H), 3,2 kg
Betriebsbedingungen	0 °C bis 42 °C, 5 % bis 99 % relative Luftfeuchte

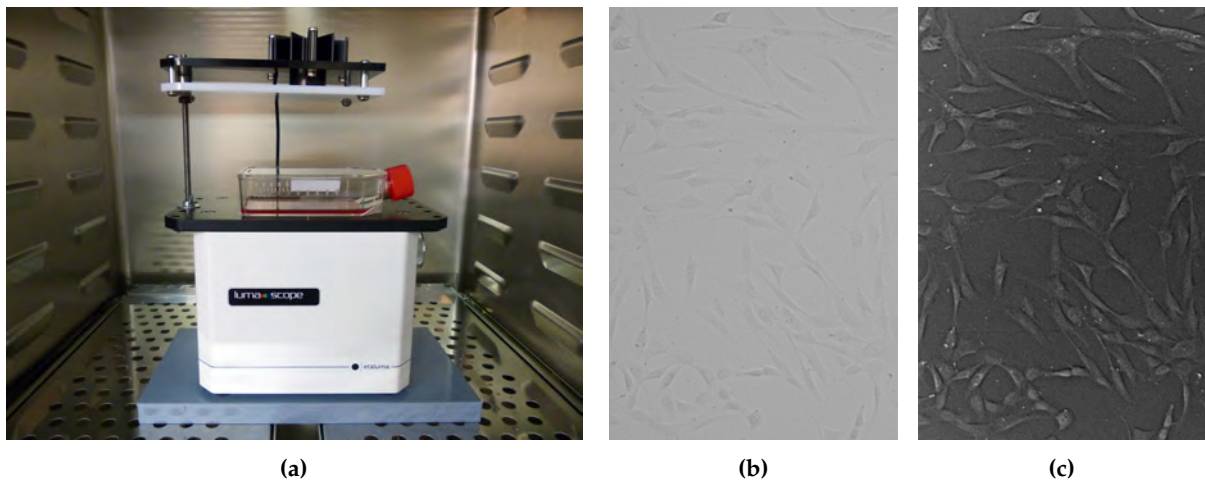


Abbildung B.6 (a) Mikroskop LumaScope 600 im Inkubator. (b) Ausschnitt einer mikroskopischen Aufnahme und (c) mittels Bildverarbeitungsprogramm optimierte Aufnahme.

Da kein Phasenkontrastsystem für das LumaScope zur Verfügung stand, wurden die Aufnahmen mittels Bildverarbeitungsprogramm invertiert. In Abbildung B.6b ist das Originalbild und in Abbildung B.6c die kontrastverstärkte Aufnahme gezeigt, auf der wesentlich mehr Details zu erkennen sind. Die Einzelbilder wurden anschließend mit der Software VirtualDub unter Verwendung eines x264 Codec zu einem Zeitrafferfilm komprimiert.

Alle Videos können zusätzlich zu den in dieser Arbeit integrierten QR-Codes über folgende Internetadressen abgerufen werden:

- Encapsulator B-395 Mikropartikel Produktion,
<http://youtu.be/STFJJdbZy4Y>
- Kultivierung von *S. cerevisiae* in Core-Shell-Mikrokapseln,
<http://youtu.be/Wo0g61Dn60I>
- Kultivierung von MSC in 2D Zellkultur,
<http://youtu.be/zSuLDqRfhXo>
- Migration von MSC in 2D Zellkultur,
<http://youtu.be/RRUvRjN1W84>
- Kultivierung von MSC im PF-Hydrogel, 4-fach Vergrößerung,
<http://youtu.be/m18fM-zMFsU>
- Kultivierung von MSC im PF-Hydrogel, 10-fach Vergrößerung,
http://youtu.be/1_4B6werKGU
- Sphäroidbildung von MSC,
<http://youtu.be/R8rGPP4oyv0>
- Zellmigration aus einem Sphäroid im PF-Hydrogel,
<http://youtu.be/GXvGkPg0FKs>
- Einfluss der Festigkeit des Hydrogels auf das Zellwachstum,
<http://youtu.be/AKI1tXLsCp8>.

Verzeichnisse

Abkürzungsverzeichnis

Calcein-AM	Calcein-Acetoxyethyl
CPOx	Polystyrolpartikel zur Sauerstoffmessung
CSM	Core-Shell-Mikrokapsel
CTB	CellTiter-Blue [®] Cell Viability Test
DA	Diacrylat
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DCM	Dichlormethan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>engl.: deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Emission
EtOH	Ethanol
Ex	Anregung, <i>engl.: excitation</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FDA	Food and Drug Administration
FF-Hydrogel	Pluronic [®] F127-Fibrinogen-Hydrogel
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gravitationskraft
G'	Speichermodul
G''	Verlustmodul
GMP	Gute Herstellungspraxis, <i>engl.: good manufacturing practice</i>

HS	Humanserum
Hz	Hertz
ISTC	International Society for Cellular Therapy
KGT	Kritische Gelierungstemperatur
kDa	Kilodalton
LED	Leuchtdiode, <i>engl.: light-emitting diode</i>
MeOH	Methanol
MEM	Minimum Essential Medium
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MSC	Mesenchymale Stammzellen, <i>engl.: mesenchymal stem cells</i>
n	Stichprobenanzahl
Na-Alginat	Natriumalginat
NaCS	Natriumcellulosesulfat
NKS	Neugeborenen Kälberserum
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie, <i>engl.: nuclear magnetic resonance</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAA	Polyacrylsäure
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, <i>engl.: phosphate buffered saline</i>
pDADMAC	Polydiallyldimethylammoniumchlorid
PEG	Polyethylenglykol
PEGDA	Polyethylenglykol-Diacrylat
PEO	Polyethylenoxid
PF-Hydrogel	PEG-Fibrinogen-Hydrogel
PFA	Paraformaldehyd
PPO	Polypropylenoxid
PTFE	Polytetrafluorethylen, Teflon [®]
PVA	Polyvinylalkohol
RFU	Relative Fluoreszenzeinheit, <i>engl.: relative fluorescence unit</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute, <i>engl.: revolutions per minute</i>

RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung, <i>engl.: standard deviation</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEA	Triethylamin
UV	Ultraviolett
v	Volumen
w	Gewicht
YM	Yeast Mold
Z	Zellen

Abbildungsverzeichnis

3.1	Schematische Darstellung und mikroskopische Aufnahmen von 2D und 3D Zellkulturen.	14
3.2	Zelltolerante und zellfördernde Hydrogele.	17
3.3	Reaktionsmechanismus der chemischen Synthese des PF-Hydrogels.	19
3.4	Schematische Darstellung eines Fibrinogen-basierten Hydrogels.	20
3.5	Reaktionsmechanismus der radikalischen Polymerisation des PF-Hydrogels.	21
3.6	Vernetzungsvarianten der Fibrinogen-basierten Hydrogele.	21
3.7	Hydrogel-Mikropartikel zur Kultivierung tierischer Zellen in gerührten Bioreaktoren.	24
3.8	Schematische Darstellung tropfenbildender Verfahren zur Verkapselung von Zellen.	26
3.9	Herstellung und Aufbau von Mikropartikeln und Core-Shell-Mikrokapseln.	27
4.1	Frontansicht des Encapsulator B-395 Pro.	30
4.2	Detailansicht des Encapsulator B-395 Pro.	30
4.3	Einzelne Bestandteile zur Herstellung von Partikeln.	31
4.4	Prozessschritte des Algorithmus zur Auswertung von Mikropartikeln.	34
4.5	Betriebskennfelder in Abhängigkeit der Vibrationsfrequenz und der Flussrate.	35
4.6	Ca-Alginat-Mikropartikel produziert mit unterschiedlichen Düsenrößen bei 1500 Hz und angepasster Flussrate.	35
4.7	Einfluss unterschiedlicher Düsenrößen auf den Partikeldurchmesser bei 1500 Hz und angepasster Flussrate.	36
4.8	Größenverteilungen der Mikropartikel für die Düsenrößen 80 µm bis 200 µm bei 1500 Hz.	37

4.9	Einfluss des Volumenstroms und der Vibrationsfrequenz auf den Partikeldurchmesser.	37
4.10	Alginate-Öl-Mikrokapseln produziert mit unterschiedlichen Core-Flussraten. . .	38
4.11	Einfluss der Core-Flussrate auf den Shell- und Core-Durchmesser bei Alginate-Öl-Mikrokapseln.	39
4.12	Alginate-Alginate-Mikrokapseln produziert mit unterschiedlichen Core-Flussraten.	40
4.13	Einfluss der Core-Flussrate auf den Shell- und Core-Durchmesser bei Alginate-Alginate-Mikrokapseln.	40
4.14	Übersicht über die Prozessparameter und ihren Einfluss auf die Partikelgröße und Produktivität.	41
4.15	Frontansicht des Rheometer MCR 302.	42
4.16	Schritte der rheologischen Messung eines photosensitiven Hydrogels.	43
4.17	Viskositätsfunktionen verschiedener Na-Alginate-Lösungen und unterschiedlicher Konzentration.	45
4.18	Viskositätsfunktionen unterschiedlich behandelte Na-Alginate-Lösungen und Fibrinogen-basierte Hydrogele.	46
4.19	Einfluss der Intensität des UV-Lichts und der Bestrahlungsdauer auf die Polymerisation des PF-Hydrogels.	47
4.20	Einfluss der PEGDA-Konzentration auf die Polymerisation des PF-Hydrogels.	49
4.21	Einfluss der Lagerung zweier PF-Hydrogele unterschiedlicher Chargen über einen Zeitraum von 90 Tagen.	50
4.22	Einfluss der PEGDA-Konzentration auf die Polymerisation des FF-Hydrogels. .	51
4.23	Einfluss der Temperatur auf die Festigkeit des FF-Hydrogels.	52
4.24	Einfluss der Temperatur und des UV-Lichts auf die Festigkeit des FF-Hydrogel.	53
4.25	Vergleich mikroskopischer Aufnahmen einer Kultivierung mit Mikropartikeln und Core-Shell-Mikrokapseln.	56
4.26	Vergleich einer Kultivierung mit Core-Shell-Mikrokapseln und Mikropartikeln.	56
4.27	Vergleich einer Kultivierung mit Mikropartikeln und Core-Shell-Mikrokapseln (Zellzahl, Glucose, Ethanol).	58
4.28	Mikroskopische Aufnahmen von Core-Shell-Mikrokapseln mit verkapselten Hefezellen zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten.	59
4.29	Darstellung des Zellwachstums und der Verlauf der Glucose- und Ethanolkonzentration einer Kultivierung von Core-Shell-Mikrokapseln.	60
4.30	Ergebnisbilder der Auswertung mittels Bildverarbeitung zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer Kultivierung von Core-Shell-Mikrokapseln.	61
4.31	CSM-Kultivierung: Zellzahl pro Mikropartikel, Fläche der Hefecuster und Durchmesser	61
4.32	CSM-Kultivierung: Durchmesser verkapselter Hefezellen, manuelle und bildbasierte Zellzahl	63
4.33	Mikroskopische Aufnahmen verschiedener Zelllinien und Primärzellen im PF-Hydrogel.	65

4.34	Mikroskopische Aufnahmen von NIH-3T3-Zellen im PF-Hydrogel.	66
4.35	Fluoreszenzaufnahmen der DAPI-Färbung von NIH-3T3-Zellen im PF-Hydrogel.	66
4.36	CTB-Test, Glucose- und Lactatkonzentrationen von NIH-3T3-Zellen im PF-Hydrogel.	67
4.37	Mikroskopische Aufnahmen von MSC im PF-Hydrogel.	69
4.38	Fluoreszenzaufnahmen der Phalloidin-DAPI-Färbung von MSC im PF-Hydrogel.	70
4.39	QR-Codes zu den Zeitrafferaufnahmen einer Kultivierung von MSC im PF-Hydrogel.	70
4.40	CTB-Test, Glucose- und Lactatkonzentrationen von MSC im PF-Hydrogel.	71
4.41	Mikroskopische Aufnahmen von PF-Hydrogelkonstrukten mit MSC.	72
4.42	Durchmesser der Hydrogelkonstrukte mit und ohne immobilisierten Zellen über eine Kultivierungsdauer von 7 Tagen.	72
4.43	Mikroskopische Aufnahmen von MSC im PF-Hydrogel mit 0 %, 1 % und 2 % PEGDA nach 7 Tagen.	73
4.44	Mikroskopische Aufnahmen immobilisierter Sphäroide im PF-Hydrogel mit unterschiedlichen PEGDA-Konzentrationen nach 7 Tagen.	75
4.45	Durchschnittliche Migrationsstrecke der Zellen im PF-Hydrogel mit verschiedenen PEGDA-Konzentrationen.	75
4.46	Sauerstoffmessungen in PF-Hydrogelkonstrukten und Sphäroiden.	77
4.47	Mikrotomschnitt eines PF-Hydrogelkonstruktes mit MSC nach 7 Tagen.	78
4.48	Mikroskopische Aufnahmen der Adipozyten.	79
4.49	Mikroskopische Aufnahmen der Mikrotomschnitte der Chondrozyten.	80
4.50	Mikroskopische Aufnahmen der Mikrotomschnitte der Osteozyten.	81
4.51	Fluoreszenzaufnahmen von MSC im FF-Hydrogel.	82
4.52	CTB-Test, Glucose- und Lactatkonzentrationen von MSC im FF-Hydrogel.	82
4.53	Kultivierung von Hep-G2-Zellen in Mikropartikeln aus Natrium-Cellulosesulfat.	84
4.54	Fluoreszenzaufnahmen von Hep-G2-Zellen in NaCS-pDADMAC-Mikropartikeln.	84
4.55	Mikroskopische Aufnahmen einer Alginate-PF-Hydrogel-Mikrokapsel mit immobilisierten MSC.	86
4.56	Kultivierung von MSC in Alginate-PF-Hydrogel-Mikrokapseln.	86
A.1	Adhärente Zellen in 2D Kultur.	96
A.2	QR-Codes zu den Zeitrafferaufnahmen von MSC in 2D Kultur.	96
B.1	Herstellung solider Hydrogelkonstrukte.	110
B.2	Herstellung solider Hydrogel-Makropartikel.	110
B.3	Kultivierungseinsätze, solide Hydrogelkonstrukte und schematische Darstellung möglicher Zelldifferenzierungen mesenchymaler Stammzellen.	111
B.4	Intensitäten der UV-Lampe Delolux 80 bei verschiedenen Amplituden.	112
B.5	Zellsiebe zur Bestimmung einer definierten Anzahl an Mikropartikeln und Validierung der Methode zur Zellzahlbestimmung.	114
B.6	Mikroskop LumaScope 600.	119

Tabellenverzeichnis

4.1	Veränderbare Parameter des Encapsulator B-395 Pro	32
4.2	Konzentrations- und Viskositätsbereiche von Na-Alginatlösungen für verschiedene Düsendurchmesser	33
4.3	Parameter und Ergebnisse einer Kultivierung von Mikropartikeln und Core-Shell-Mikrokapseln.	55
5.1	Vor- und Nachteile der PF- und FF-Hydrogele	92
A.1	Geräte und Hersteller	99
A.2	Materialien und Hersteller	100
A.3	Chemikalien, Reagenzien und Hersteller	101
A.4	Software und Hersteller	104
B.1	Technische Daten des Rheometer MCR 302	112
B.2	Technische Daten des Gaschromatographen	115
B.3	Technische Daten des LumaScope 600	118

Literaturverzeichnis

- [1] WHO. *The top 10 causes of death*. Hrsg. von World Health Organization. 2012.
- [2] R. Zweigerdt. »Large scale production of stem cells and their derivatives«. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 114 (2009), S. 201–235.
- [3] M. F. Pittenger. »Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells«. In: *Science* 284.5411 (1999), S. 143–147.
- [4] Y. Jiang *et al.* »Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow«. In: *Nature* 418.6893 (2002), S. 41–49.
- [5] D. Smiler, M. Soltan und M. Albitar. »Toward the identification of mesenchymal stem cells in bone marrow and peripheral blood for bone regeneration«. In: *Implant Dentistry* 17.3 (2008), S. 236–247.
- [6] A. J. Engler *et al.* »Matrix elasticity directs stem cell lineage specification«. In: *Cell* 126.4 (2006), S. 677–689.
- [7] C. S. Chen. »Geometric control of cell life and death«. In: *Science* 276.5317 (1997), S. 1425–1428.
- [8] M. Rimann und U. Graf-Hausner. »Synthetic 3D multicellular systems for drug development«. In: *Current Opinion in Biotechnology* 23.5 (2012), S. 803–809.

- [9] L. G. Griffith und M. A. Swartz. »Capturing complex 3D tissue physiology in vitro«. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7.3 (2006), S. 211–224.
- [10] A. Abbott. »Cell culture: biology's new dimension«. In: *Nature* 424.6951 (2003), S. 870–872.
- [11] R. Langer und J. P. Vacanti. »Tissue engineering«. In: *Science* 260.5110 (1993), S. 920–926.
- [12] G. Hamilton. »Multicellular spheroids as an in vitro tumor model«. In: *Cancer Letters* 131.1 (1998), S. 29–34.
- [13] O. W. Petersen *et al.* »Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells«. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89.19 (1992), S. 9064–9068.
- [14] J. Wei *et al.* »The importance of three-dimensional scaffold structure on stemness maintenance of mouse embryonic stem cells«. In: *Biomaterials* 35.27 (2014), S. 7724–7733.
- [15] F. Hirschhaeuser *et al.* »Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again«. In: *Journal of Biotechnology* 148.1 (2010), S. 3–15.
- [16] F. Pampaloni, E. G. Reynaud und Stelzer, Ernst H K. »The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue«. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8.10 (2007), S. 839–845.
- [17] S. Breslin und L. O'Driscoll. »Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery«. In: *Drug Discovery Today* 18.5-6 (2013), S. 240–249.
- [18] R.-Z. Lin, R.-Z. Lin und H.-Y. Chang. »Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research«. In: *Biotechnology Journal* 3.9-10 (2008), S. 1172–1184.
- [19] M. W. Tibbitt und K. S. Anseth. »Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture«. In: *Biotechnology and Bioengineering* 103.4 (2009), S. 655–663.
- [20] W.-S. Hu. *Cell Culture Bioprocess Engineering*. University of Minnesota, 2012.
- [21] A. L. Rosa, de Oliveira, Paulo Tambasco und M. M. Beloti. »Macroporous scaffolds associated with cells to construct a hybrid biomaterial for bone tissue engineering«. In: *Expert Review of Medical Devices* 5.6 (2008), S. 719–728.
- [22] J. L. Drury und D. J. Mooney. »Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications«. In: *Biomaterials* 24.24 (2003), S. 4337–4351.
- [23] K. T. Nguyen und J. L. West. »Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications«. In: *Biomaterials* 23.22 (2002), S. 4307–4314.
- [24] D. Seliktar. »Designing cell-compatible hydrogels for biomedical applications«. In: *Science* 336.6085 (2012), S. 1124–1128.
- [25] K. Y. Lee und D. J. Mooney. »Hydrogels for tissue engineering«. In: *Chemical Reviews* 101.7 (2001), S. 1869–1880.

- [26] M. P. Lutolf und J. A. Hubbell. »Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering«. In: *Nature Biotechnology* 23.1 (2005), S. 47–55.
- [27] A. Patel und K. Mequanint. »Hydrogel biomaterials«. In: *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges*. Hrsg. von R. Fazel. InTech, 2011.
- [28] I. M. El-Sherbiny und M. H. Yacoub. »Hydrogel scaffolds for tissue engineering: progress and challenges«. In: *Global Cardiology Science & Practice* 2013.3 (2013), S. 316–342.
- [29] N. A. Peppas *et al.* »Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology«. In: *Advanced Materials* 18.11 (2006), S. 1345–1360.
- [30] J. Kopeček und J. Yang. »Hydrogels as smart biomaterials«. In: *Polymer International* 56.9 (2007), S. 1078–1098.
- [31] S. J. Bryant und K. S. Anseth. »Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels«. In: *Journal of Biomedical Materials Research* 59.1 (2002), S. 63–72.
- [32] J. Zhu. »Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering«. In: *Biomaterials* 31.17 (2010), S. 4639–4656.
- [33] M. Gonen-Wadmany, L. Oss-Ronen und D. Seliktar. »Protein-polymer conjugates for forming photopolymerizable biomimetic hydrogels for tissue engineering«. In: *Biomaterials* 28.26 (2007), S. 3876–3886.
- [34] L. Oss-Ronen und D. Seliktar. »Photopolymerizable hydrogels made from polymer-conjugated albumin for affinity-based drug delivery«. In: *Advanced Engineering Materials* 12.1-2 (2010), B45–B52.
- [35] L. Almany und D. Seliktar. »Biosynthetic hydrogel scaffolds made from fibrinogen and polyethylene glycol for 3D cell cultures«. In: *Biomaterials* 26.15 (2005), S. 2467–2477.
- [36] D. Seliktar und Y. Shachaf. »Scaffolds formed from polymer-protein conjugates, methods of generating same and uses thereof«. WO 2011/073991 Al. 2011.
- [37] S. Herrick *et al.* »Fibrinogen«. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31.7 (1999), S. 741–746.
- [38] M. Gonen-Wadmany, R. Goldshmid und D. Seliktar. »Biological and mechanical implications of PEGylating proteins into hydrogel biomaterials«. In: *Biomaterials* 32.26 (2011), S. 6025–6033.
- [39] D. Cohn, A. Sosnik und S. Garty. »Smart hydrogels for in situ generated implants«. In: *Biomacromolecules* 6.3 (2005), S. 1168–1175.
- [40] P. Alexandridis und T. Alan Hatton. »PEO-PPO-PEO block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and mode-

- ling«. In: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 96.1-2 (1995), S. 1–46.
- [41] Y. Shachaf, M. Gonen-Wadmany und D. Seliktar. »The biocompatibility of PluronicF127 fibrinogen-based hydrogels«. In: *Biomaterials* 31.10 (2010), S. 2836–2847.
- [42] S. Halstenberg *et al.* »Biologically engineered protein-graft-poly(ethylene glycol) hydrogels: A cell adhesive and plasmin-degradable biosynthetic material for tissue repair«. In: *Biomacromolecules* 3.4 (2002), S. 710–723.
- [43] D. Dikovsky, H. Bianco-Peled und D. Seliktar. »Defining the role of matrix compliance and proteolysis in three-dimensional cell spreading and remodeling«. In: *Biophysical Journal* 94.7 (2008), S. 2914–2925.
- [44] I. Mironi-Harpaz *et al.* »Photopolymerization of cell-encapsulating hydrogels: crosslinking efficiency versus cytotoxicity«. In: *Acta Biomaterialia* 8.5 (2012), S. 1838–1848.
- [45] C. G. Williams *et al.* »Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation«. In: *Biomaterials* 26.11 (2005), S. 1211–1218.
- [46] T. Billiet *et al.* »A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering«. In: *Biomaterials* 33.26 (2012), S. 6020–6041.
- [47] A. Ovsianikov *et al.* »Two-photon polymerization technique for microfabrication of CAD-designed 3D scaffolds from commercially available photosensitive materials«. In: *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 1.6 (2007), S. 443–449.
- [48] S. V. Murphy und A. Atala. »3D bioprinting of tissues and organs«. In: *Nature Biotechnology* 32.8 (2014), S. 773–785.
- [49] B. V. Slaughter *et al.* »Hydrogels in regenerative medicine«. In: *Advanced Materials* 21.32-33 (2009), S. 3307–3329.
- [50] N. Peppas. »Hydrogels in pharmaceutical formulations«. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50.1 (2000), S. 27–46.
- [51] M. Simons *et al.* »Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: An expert panel summary«. In: *Circulation* 11.102 (2000), E73–86.
- [52] R. Goldshmid. »A 3D cell expansion system of MSCs using suspension culture fibrinogen based hydrogels and thermoresponsive biopolymer microsphere cell carriers in bioreactors«. Proposal, 2012.
- [53] D. Seliktar und P. Lindner. »Controlled cultivation of mammalian cells in 3D suspension environment«. Proposal, 2012.
- [54] K. Y. Lee und D. J. Mooney. »Alginate: properties and biomedical applications«. In: *Progress in Polymer Science* 37.1 (2012), S. 106–126.

- [55] U. Zimmermann *et al.* »Hydrogel-based non-autologous cell and tissue therapy«. In: *BioTechniques* 29.3 (2000), S. 564–581.
- [56] M. Chavarri, I. Maranon und M. Carmen. »Encapsulation technology to protect probiotic bacteria«. In: *Probiotics*. Hrsg. von E. Rigobelo. InTech, 2012.
- [57] X. Huang *et al.* »Microenvironment of alginate-based microcapsules for cell culture and tissue engineering«. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 114.1 (2012), S. 1–8.
- [58] U. Prüsse *et al.* »Comparison of different technologies for alginate beads production«. In: *Chemical Papers* 62.4 (2008), S. 364–374.
- [59] C. Heinzen, A. Berger und I. Marison. »Use of vibration technology for jet break-up for encapsulation of cells and liquids in monodisperse microcapsules«. In: *Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology*. Bd. 8A, S. 257–275.
- [60] A. M. Gañán-Calvo *et al.* »Building functional materials for health care and pharmacy from microfluidic principles and flow focusing«. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 65.11-12 (2013), S. 1447–1469.
- [61] L. Martín-Banderas *et al.* »Flow focusing: a versatile technology to produce size-controlled and specific-morphology microparticles«. In: *Small* 1.7 (2005), S. 688–692.
- [62] B. Bugarski *et al.* »Electrostatic droplet generation: mechanism of polymer droplet formation«. In: *AIChE Journal* 40.6 (1994), S. 1026–1031.
- [63] B. G. Amsden und M. Goosen. »An examination of factors affecting the size, distribution and release characteristics of polymer microbeads made using electrostatics«. In: *Journal of Controlled Release* 43.2-3 (1997), S. 183–196.
- [64] P. A. Haas. »Formation of uniform liquid drops by application of vibration to laminar jets«. In: *Industrial & Engineering Chemistry Research* 31.3 (1992), S. 959–967.
- [65] L. Rayleigh. »On the instability of jets«. In: *Proceedings of the London Mathematical Society* s1-10.1 (1878), S. 4–13.
- [66] H. Brandenberger und F. Widmer. »A new multinozzle encapsulation/immobilisation system to produce uniform beads of alginate«. In: *Journal of Biotechnology* 63.1 (1998), S. 73–80.
- [67] S. Mazzitelli *et al.* »Production and characterization of alginate microcapsules produced by a vibrational encapsulation device«. In: *Journal of Biomaterials Applications* 23.2 (2008), S. 123–145.
- [68] D. Serp *et al.* »Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization«. In: *Biotechnology and Bioengineering* 70.1 (2000), S. 41–53.

- [69] L. Martín-Banderas, A. M. Ganán-Calvo und M. Fernández-Arevalo. »Making drops in microencapsulation processes«. In: *Letters in Drug Design & Discovery* 7.4 (2010), S. 300–309.
- [70] C.-H. Choi *et al.* »Generation of monodisperse alginate microbeads and in situ encapsulation of cell in microfluidic device«. In: *Biomedical Microdevices* 9.6 (2007), S. 855–862.
- [71] W.-H. Tan und S. Takeuchi. »Monodisperse alginate hydrogel microbeads for cell encapsulation«. In: *Advanced Materials* 19.18 (2007), S. 2696–2701.
- [72] A. Luque *et al.* »Silicon microdevice for emulsion production using three-dimensional flow focusing«. In: *Journal of Microelectromechanical Systems* 16.5 (2007), S. 1201–1208.
- [73] S. Seiffert. »Microgel capsules tailored by droplet-based microfluidics«. In: *ChemPhysChem: A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry* 14.2 (2013), S. 295–304.
- [74] C. Kim *et al.* »Generation of core-shell microcapsules with three-dimensional focusing device for efficient formation of cell spheroid«. In: *Lab on a chip* 11.2 (2011), S. 246–252.
- [75] M. Ma *et al.* »Core-shell hydrogel microcapsules for improved islets encapsulation«. In: *Advanced Healthcare Materials* 2.5 (2013), S. 667–672.
- [76] K. Alessandri *et al.* »Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro«. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110.37 (2013), S. 14843–14848.
- [77] C. Lüder. *Auswertung von Stammzellkultivierungen mittels digitaler Bildverarbeitung*. Wissenschaftliche Arbeit, Leibniz Universität Hannover, 2009.
- [78] T. Sakai und N. Hoshino. »Production of uniform droplets by longitudinal vibration of audio frequency«. In: *Journal of Chemical Engineering of Japan* 13.4 (1980), S. 263–268.
- [79] A. F. Berger. »Herstellung monodisperser Partikel aus einer wässrigen Lösung mittels Fluidprillen/Gefriertrocknen oder chemischer Reaktion«. Diss. Zürich: ETH, 2001.
- [80] Büchi Labortechnik GmbH. *Operation Manual Encapsulator B-395 Pro*. 2012.
- [81] Anton Paar GmbH. *Instruction Manual MCR Series*. 2014.
- [82] T. Mezger. *Das Rheologie-Handbuch: Für Anwender von Rotations- und Oszillations-Rheometern*. 3., überarb. Aufl. Farbe- und Lack-Edition. Hannover: Vincentz Network, 2010.
- [83] A. Atala und R. P. Lanza. *Methods of Tissue Engineering*. San Diego, CA: Academic Press, 2001.
- [84] W. J. Leo, A. J. McLoughlin und D. M. Malone. »Effects of sterilization treatments on some properties of alginate solutions and gels«. In: *Biotechnology Progress* 6.1 (1990), S. 51–53.
- [85] A. Bluma *et al.* »In-situ imaging sensors for bioprocess monitoring: state of the art«. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398.6 (2010), S. 2429–2438.

- [86] G. Rudolph *et al.* »Online monitoring of microcarrier based fibroblast cultivations with in situ microscopy«. In: *Biotechnology and Bioengineering* 99.1 (2008), S. 136–145.
- [87] E. Volkmer *et al.* »Hypoxia in static and dynamic 3D culture systems for tissue engineering of bone«. In: *Tissue Engineering Part A* 14.8 (2008), S. 1331–1340.
- [88] E. Schmäzlin *et al.* »Ortsaufgelöste Sauerstoffmessungen in biologischen Proben«. In: *Biophotonik* 2.1-2 (2014), S. 34–37.
- [89] C. R. Nuttelman, M. C. Tripodi und K. S. Anseth. »In vitro osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells photoencapsulated in PEG hydrogels«. In: *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 68.4 (2004), S. 773–782.

Verzeichnis entstandener Abschlussarbeiten

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Bachelor- und Masterarbeiten angefertigt, deren experimentelle Durchführungen vom Autor betreut wurden. Die im Folgenden kenntlich gemachten Abbildungen basieren auf den Ergebnissen der jeweiligen Abschlussarbeit.

2014 Rheologische Charakterisierung Fibrinogen-basierter Hydrogele und Kultivierung von Zellen in soliden 3D Systemen

Lena Stuckenberg, Masterarbeit.

Abbildungen 4.19, 4.20b, 4.21, 4.23a, 4.44, 4.45, 4.55.

2014 Kultivierung von *S. cerevisiae* in Core-Shell-Microbeads

Nicolai Tornow, Bachelorarbeit.

Abbildungen 4.25, 4.26, 4.27, 4.28, 4.29, 4.30, 4.31a, B.5b.

2014 Kultivierung und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in Hydrogelen

Sina Christoffers, Bachelorarbeit.

Abbildungen 4.38, 4.40, 4.41, 4.42, 4.48, 4.49, 4.50.

2013 Immobilisierung und Kultivierung von Säugerzellen in Hydrogel-Microbeads

Caroline Schneider-Barthold, Masterarbeit.

Abbildungen 4.33a-4.33f, 4.34, 4.35, 4.53, 4.54.

2012 Immobilisierung von Säugerzellen in Hydrogelen für die 3D Zellkultur

Mareike Rüter, Bachelorarbeit.

Abbildungen 4.33g-4.33i.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Ferdinand M. Rüdinger
Geburtsdatum: 16.06.1986
Geburtsort: Freiburg im Breisgau
Nationalität: deutsch

Ausbildung

- 2011-11 ... 2014-11 **Promotionsstudium** »*Chemie*«
Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover
Dissertation: Solide 3D Hydrogelsysteme zur Kultivierung tierischer Zellen
- 2009-10 ... 2011-09 **Masterstudium** »*Life Science*« an der Leibniz Universität Hannover
Abschluss: Hochschulgrad »*Master of Science*«
Masterarbeit: Kultivierung und Überwachung von CHO-Zellen in Suspensionskultur
Gesamtnote: ausgezeichnet
- 2006-10 ... 2009-08 **Bachelorstudium** »*Life Science*« an der Leibniz Universität Hannover
Abschluss: Hochschulgrad »*Bachelor of Science*«
Bachelorarbeit: Einfluss der Salzfracht bei der Ethanolgewinnung durch *Kluyveromyces marxianus* aus deproteinisiertem Molkenkonzentrat
Gesamtnote: ausgezeichnet

Publikationen und Konferenzbeiträge

- 2015 Advanced Cellular Screening System for Nanoparticle Safety Testing**
F. Sambale, F. Stahl, F. Rüdinger, D. Seliktar, C. Kasper, D. Bahnemann, T. Scheper.
Article, *Journal of Nanomaterials*, submitted.
- 2015 Online Monitoring of 3D Cell Cultures With Help of Time-Lapse Microscopy**
F. Sambale, H. Richter, A. Lavrentieva, F. Rüdinger, T. Scheper.
Poster, *Focus on Microscopy*, Göttingen, Germany.
- 2014 Hydrogels for 3D Mammalian Cell Culture: A Starting Guide for Laboratory Practice**
F. Rüdinger, A. Lavrentieva, C. Blume, I. Pepelanova, T. Scheper.
Article, *Applied Microbiology and Biotechnology* 99.2 (2005), 623-636.
- 2014 Core-Shell Microcapsules for Cultivation of Mammalian Cells in 3D Suspension Environment**
F. Rüdinger, L. Stuckenberg, A. Lavrentieva, O. Kossover, D. Seliktar, T. Scheper.
Poster, *3D Cell Culture 2014 - Advanced Model Systems, Applications & Enabling Technologies*, Freiburg, Germany.
- 2014 Application of PEG-Fibrinogen-based Hydrogel for 3D Cultivation of Various Mammalian Cell Types**
F. Rüdinger, A. Lavrentieva, O. Kossover, D. Seliktar, T. Scheper.
Poster, *SelectBio 2014 - Advances in Cellular Assays & Cell Culture*, Barcelona, Spain.
- 2014 Determination of Viscoelastic Properties and Live Cell Monitoring**
F. Rüdinger, A. Lavrentieva, T. Scheper, C. Blume.
Poster, *Biofabrication for NIFE 2014*, Hannover, Germany.
- 2014 Development of Dynamic 3D Cell Culture Models for *in vitro* Biocompatibility Testing**
F. Rüdinger, A. Lavrentieva, F. Sambale, I. Pepelanova, F. Stahl, T. Scheper, C. Blume.
Poster, *Biofabrication for NIFE 2014*, Hannover, Germany.
- 2013 Cultivation of Mammalian Cells in Hydrogels for 3D Cell Culture**
F. Rüdinger, C. Schneider-Barthold, D. Seliktar, T. Scheper.
Poster, *Conference of Scientific Cooperation between Lower Saxony and Israel 2013*, Hannover, Germany.
- 2013 Comparative Study of Non-invasive Monitoring via Infrared Spectroscopy for Mammalian Cell Cultivations**
M. Sandor, F. Rüdinger, R. Bienert, C. Grimm, D. Solle, T. Scheper.
Article, *Journal of Biotechnology* 168 (2013), 636-645.

- 2013 NIR Spectroscopy for Bioprocess Monitoring & Control**
M. Sandor, F. Rüdinger, D. Solle, R. Bienert, C. Grimm, S. Groß, T. Scheper.
Poster, *23rd ESACT Meeting 2013*, Lille, France.
- 2013 NIR Spectroscopy for Process Monitoring and Control in Mammalian Cell Cultivation**
M. Sandor, F. Rüdinger, D. Solle, R. Bienert, C. Grimm, T. Scheper.
Article, *Bioprocess International* 11.8 (2013), 40-49.
- 2013 Production and Characterization of Alginate-based Microcapsules for Cell Encapsulation**
F. Rüdinger, O. Kossover, D. Seliktar, T. Scheper.
Poster, *Dechema Jahrestagung 2013*, Frankfurt/Main, Germany.
- 2012 Überwachung von Bioprozessen mithilfe der NIR-Spektroskopie**
R. Bienert, M. Sandor, F. Rüdinger, D. Solle, C. Grimm, T. Scheper.
Lecture, *Dechema Jahrestagung 2012*, Heidelberg, Germany.
- 2012 Evaluation der Infrarotspektroskopie zur Beobachtung und Regelung von Tierzellkultivierungen**
D. Solle, M. Sandor, F. Rüdinger, R. Bienert, C. Grimm, T. Scheper.
Lecture, *Dechema Jahrestagung 2012*, Heidelberg, Germany.
- 2012 Online-Überwachung von Säugetierzellkultivierungen mittels Nah- und Mittelinfrarotspektroskopie**
M. Sandor, F. Rüdinger, R. Bienert, D. Solle, C. Grimm, T. Scheper.
Poster, *Dechema Jahrestagung 2012*, Heidelberg, Germany.
- 2012 Überwachung von CHO-Kultivierungen mit verschiedenen spektroskopischen Methoden**
F. Rüdinger, M. Sandor, R. Bienert, D. Solle, C. Grimm, T. Scheper.
Poster, *Dechema Jahrestagung 2012*, Heidelberg, Germany.
- 2011 In-situ Microscopy and 2D Fluorescence Spectroscopy as Online Methods for Monitoring CHO Cells During Cultivation**
S. Bonk, M. Sandor, F. Rüdinger, B. Tscheschke, A. Prediger, A. Babitzky, S. Beutel, T. Scheper.
Poster, *22nd ESACT Meeting 2011*, Vienna, Austria.