

# Herstellung abgerundeter Mikrofaserfragmente aus Polycaprolacton und deren Einsatz als biofunktionale und rheologische Additive in der Biofabrikation

Von der Fakultät für Ingenieurwissenschaften  
der Universität Bayreuth  
zur Erlangung der Würde  
**Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)**  
genehmigte Dissertation

von

**Dipl.-Ing. (Univ.) David Sonnleitner**

aus

Eggenfelden

Erstgutachter: Dr.-Ing. Gregor Lang  
Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheibel  
Tag der mündlichen Prüfung: 23.02.2024

Lehrstuhl Biomaterialien  
Universität Bayreuth  
2024



Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht:

„Biomimetic Protein-based Elastomers – Processing and Properties of regenerated *B. mori* silk and recombinant spider silk fibers“,

Lang G, **Sonnleitner D**

*Royal Society of Chemistry* (2022)

ISBN-10: 1788010787

„Melt Electrowriting to produce microfiber fragments“,

Haag H, **Sonnleitner D**, Lang G, Dalton PD

*Polymers for advanced technologies* (2022)

<https://doi.org/10.1002/pat.5641>

„PCL micro-dumbbells – A new class of polymeric particles reveals morphological bio-functionality“,

**Sonnleitner D**, Schäfer N, Wieland A, Fischer L, Pasberg P, Thievensen I, Lang G

*Applied Materials Today*, Volume 24 (2021)

<https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.101097>

„Correlating rheology and printing performance of fiber-reinforced bioinks to assess predictive modelling for biofabrication“,

**Sonnleitner D**, Schrüfer S, Berglund L, Schubert DW, Lang G

*Journal of Materials Research* (2021)

<https://doi.org/10.1557/s43578-021-00276-5>

„Approaches to inhibit biofilm formation applying natural and artificial silk-based materials“,

**Sonnleitner D**, Sommer C, Scheibel T, Lang G

*Materials Science and Engineering: C* (2021)

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112458>

„A Novel Simple Approach to Material Parameters from Commonly Accessible Rheometer Data“,

Schrüfer S, **Sonnleitner D**, Lang G, Schubert DW

*Polymers*, (2020)

<https://doi.org/10.3390/polym12061276>



# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Summary	VIII
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Aktueller Stand der Organtransplantation . . . . .	1
1.2 Xenotransplantation . . . . .	5
1.3 Regenerative Medizin und Tissue Engineering . . . . .	7
1.4 Biofabrikation . . . . .	8
1.5 Biodruckverfahren . . . . .	9
1.5.1 Tropfendruck . . . . .	9
1.5.2 Strangdruck . . . . .	11
1.5.3 Flächendruck . . . . .	13
1.5.4 Volumendruck . . . . .	14
1.6 Biotinten . . . . .	16
1.7 Additive . . . . .	18
1.7.1 Fasermorphologie . . . . .	20
1.7.2 Faser-Matrix Interaktionsmechanismen . . . . .	21
1.8 Natürliche Zell-Faser-Interaktionen . . . . .	21
1.9 Zielsetzung . . . . .	25
1.9.1 Herstellung von Faserfragmenten . . . . .	25

1.9.2	Interaktion zwischen Fasern und Hydrogelen . . . . .	26
1.9.3	Interaktion zwischen Fasern und Zellen . . . . .	26
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>28</b>
2.1	Materialien . . . . .	28
2.1.1	Verbrauchsmittel . . . . .	28
2.1.2	Chemikalien . . . . .	29
2.1.3	Geräte . . . . .	31
2.1.4	Software . . . . .	32
2.2	Methoden . . . . .	33
2.2.1	Elektrostatisches Faserspinnen aus Lösung . . . . .	33
2.2.2	Scale-up des Elektrospleinverfahrens und Extraktion der Fragmente aus dem Elektrospleinprozess . . . . .	35
2.2.3	Schmelz-Elektro-Schreib-Verfahren . . . . .	35
2.2.4	Photolithografische Herstellung von MEW-Kollektoren . . . . .	36
2.2.5	Oberflächenmodifikation der PCL-Faserfragmente . . . . .	38
2.2.6	Scherrheologische Messungen . . . . .	39
2.2.7	Modelle zur Beschreibung rheologischer Messungen . . . . .	44
2.2.8	Linear-Viskoelastische Modellierung . . . . .	45
2.2.9	Herstellung der Hydrogele . . . . .	50
2.2.10	3D-Extrusionsdruck von Hydrogelen . . . . .	51
2.2.11	Rasterelektronenmikroskopie . . . . .	52
2.2.12	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie . . . . .	53
2.2.13	Kontaktwinkelmessung . . . . .	53
2.2.14	Zellkulturexperimente . . . . .	54
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
3.1	Herstellung von Faserfragmenten in Hantelform aus Polycaprolacton . . . . .	57

3.1.1	Einfluss der Polymerkonzentration und des Molekulargewichtes auf die Morphologie der Fragmente . . . . .	59
3.1.2	Rheologische Untersuchung der Spinnlösungen . . . . .	64
3.1.3	Vergleich zwischen Elektrosponnen aus Polymerlösung und elektrostatischem Schmelzspinnen . . . . .	66
3.2	Einfluss der PCL-Faserfragmente auf Hydrogele . . . . .	70
3.2.1	Einfluss der PCL-Faserfragmente auf die Morphologie von Hydrogelen im getrockneten Zustand . . . . .	70
3.2.2	Einfluss der PCL-Faserfragmente auf die Rheologie von Hydrogelen aus Alginat, Pluronic und eADF4(C16) . . . . .	74
3.2.3	Rheologische Modellierung . . . . .	87
3.2.4	Einfluss der PCL-Fragmente auf die Strangverbreiterung . . . . .	90
3.3	Analyse der Fragment-Zell-Interaktion . . . . .	95
3.3.1	Biofunktionalisierung von PCL-Faserfragmenten . . . . .	95
3.3.2	Adhäsion und Zellviabilität . . . . .	101
3.3.3	Zeitliche Entwicklung der Interaktion von Tumorzellen mit PCL-Faserfragmenten . . . . .	103
3.3.4	Zell-Interaktion mit PCL-Faserfragmenten unterschiedlicher Morphologie . . . . .	105
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>109</b>
4.1	Herstellung hantelförmiger PCL-Fragmente . . . . .	110
4.1.1	Rheologische Voraussetzungen . . . . .	111
4.1.2	Faserfragmentierung im elektrostatischen Spinnprozess . . . . .	114
4.1.3	Fragmentierung im Schmelz-Elektro-Schreibverfahren . . . . .	124
4.1.4	Faserproduktionsrate im Vergleich . . . . .	129
4.2	Fließverhalten und Druckbarkeit faserverstärkter Hydrogele . . . . .	130
4.2.1	Vergleich mit Messmethoden aus der Literatur . . . . .	130
4.2.2	Scherrheologische Evaluation . . . . .	132
4.2.3	Rheologische Modellierung . . . . .	133

4.2.4	Praxisnahe Druckversuche . . . . .	135
4.2.5	Einfluss der Zeitabhängigkeit . . . . .	138
4.2.6	Systematischer Ansatz zur Korrelation von praxisnahen Druckversuchen mit rheologischen Kennwerten . . . . .	138
4.2.7	Limitierungen dieses Ansatzes . . . . .	140
4.3	Einfluss von Fasereigenschaften auf die Interaktion mit Zellen . . . . .	142
4.3.1	Faserdurchmesser . . . . .	142
4.3.2	Zeitlicher Einfluss . . . . .	144
4.3.3	Faserform . . . . .	145
4.3.4	Faserausrichtung . . . . .	147
4.3.5	Modell zum Einfluss der Oberflächenkrümmung auf Zelladhäsionsvorgänge . . . . .	149
4.3.6	Materialeigenschaften . . . . .	152
<b>Literaturverzeichnis</b>		<b>154</b>
	Abbildungsverzeichnis . . . . .	174
	Tabellenverzeichnis . . . . .	181
	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	182
	Danksagung . . . . .	184
	Erklärung . . . . .	186

# Zusammenfassung

Die in Deutschland aktuell gültige ‚erweiterte Entscheidungslösung‘ bei der Organspende führt zu langen Wartelisten für Spenderorgane, so dass 780 Patienten allein im Jahr 2020 verstarben, während sie auf ein Spenderorgan warteten. Im Durchschnitt stehen doppelt so viele Patienten auf den Wartelisten wie Transplantationen pro Jahr durchgeführt werden können. Weder die Einführung von Spenderketten noch die Fortschritte in der Xenotransplantation können diesen Bedarf bislang decken. Aus diesem Grund wird intensiv an der Entwicklung des Tissue Engineering und im Speziellen der Biofabrikation gearbeitet, die es ermöglichen soll, Organe aus den körpereigenen Zellen des Patienten (autologes Verfahren) mit Hilfe von Biotinten mittels 3D-Druck herzustellen.

Die verschiedenen Druckverfahren für die Biofabrikation von Organen werden ständig verbessert, dabei ist der Dispensdruck momentan die am häufigsten eingesetzte Technik. Bei diesem Verfahren wird im sogenannten Biofabrikationsfenster gearbeitet, einem Kompromiss aus Auflösung und Zellviabilität. Um dieses Prozessfenster weiter in Richtung höhere Auflösung und gleichzeitig hohem Zellüberleben zu verschieben, werden als Additive unter anderem Fasern als zusätzliches hierarchisches Element in das Hydrogel eingebracht. Dadurch soll die Formstabilität verbessert und den Zellen eine attraktive Oberfläche zur Adhäsion und Ausrichtung gegeben werden.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich daher in drei Teilbereiche. Während im ersten Teil die Entwicklung und Herstellung von Faserfragmenten mit neuartiger Morphologie dargestellt wird, beschreiben die beiden anderen Teilbereiche deren Einfluss auf das Druckverhalten von Hydrogelen sowie die Auswirkungen auf die Interaktion mit verschiedenen Zelltypen.

Als Grundlage, der in dieser Arbeit entwickelten, neuartigen Faserfragmente dient das Polymer Polycaprolacton (PCL), welches von der US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel (FDA) als Implantatmaterial zugelassen ist. Dieses kann sowohl mittels elektrostatischem Spinnen aus Lösung (Elektrospinnen) als auch durch elektrostatisches Schmelzspinnen (MEW) zu Fasern verarbeitet werden. Für das Elektrospinnen wird ein Prozessfenster identifiziert, in dem eine bisher nicht beschriebene Morphologie von handtelförmigen Faserfragmenten kontinuierlich erzeugt werden kann. Die Entstehung dieser

neuartigen Morphologie wird in dieser Arbeit durch ein Modell erklärt, welches das entropieelastische Kriechen nach dem Auftreffen der Faser auf den Kollektor als einen entscheidenden Faktor für die Fragmentierung identifiziert. Durch Variation der Konzentration (10-30 %) und der Molekulargewichtsanteile (10/45/80 kDa) des PCL kann die resultierende Morphologie in einem begrenzten Rahmen kontrolliert beeinflusst werden. Die größten Aspektverhältnisse der Fragmente von über 20 können nur mit Mischungen der extremen Molekulargewichtsanteile (10/80 kDa) bei Konzentrationen um 25 % w/v und einem Mischungsverhältnis von 8:2 erreicht werden.

Ein vergleichbarer Fragmentierungsprozess kann bei der Verarbeitung von PCL mittels MEW beobachtet werden. Allerdings sind hier die Schmelztemperatur, die Umgebungstemperatur sowie die Oberflächenbeschaffenheit des speziell gefertigten Kollektors entscheidende Faktoren. Mittels Photolithographie werden auf dem Kollektor Stege unterschiedlicher Breite und mit zunehmendem Abstand erzeugt. Durch die Variation der Stegbreite lässt sich das Aspektverhältnis der entstehenden Fragmente präzise steuern, während der Stegabstand die Morphologie der abgerundeten Enden beeinflusst. Ein größerer Stegabstand führt im Verhältnis zum Faserdurchmesser zu verdickten Kugelenden, bis bei 85  $\mu\text{m}$  Stegabstand ein Maximalwert dieses Verhältnisses von etwa 1,5 erreicht wird.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit werden die zuvor beschriebenen PCL-Faserfragmente mit Hydrogelen gemischt, um deren Auswirkungen auf die Druckeigenschaften zu bestimmen. Da in der Literatur bisher kein breiter Konsens über die Definition der Druckbarkeit besteht, werden hierfür eigene Methoden entwickelt. Unter Berücksichtigung der am häufigsten verwendeten rheologischen Tests wird ein neues Messprotokoll entwickelt, das eine hohe Informationsdichte in kurzer Zeit (40 min) und mit geringem Materialverbrauch (200  $\mu\text{l}$ ) pro Messzyklus gewährleistet. Für die rheologischen Untersuchungen werden Nanofasern aus Cellulose (CeNF) als Referenzsystem verwendet und beide Fasersysteme in jeweils drei unterschiedlichen Konzentrationen mit Hydrogelen auf Basis von Alginat, Pluronic und rekombinantem Spinnenseidenprotein (eADF4(C16)) getestet.

Die Integration beider Fasersysteme in die Hydrogele führt zu einer Steigerung der komplexen Viskositäten und einem Anstieg der Fließkoeffizienten nach Power-Law-Auswertung, während das Scherverdünnungsverhalten nicht beeinflusst wird. Beide Systeme verbessern somit die rheologischen Eigenschaften, jedoch müssen PCL-Fragmente aufgrund ihrer geringeren aktiven Oberfläche in wesentlich höheren Konzentrationen als CeNF eingesetzt werden, um vergleichbare Effekte zu erzielen. Durch die Anwendung rheologischer Modelle, wie dem integrierten Burgers-Modell, kann die Viskosität des Dämpfers des Maxwell-Elements  $\eta_1$  als die signifikanteste Einflussgröße der Fasersysteme auf das rheologische Verhalten der Hydrogele bestimmt werden.

Zusätzliche Druckversuche zeigen jedoch, dass das auf Pluronic basierende Hydrogel bei Zugabe einer kritischen Konzentration von PCL-Fragmenten ( $> 5\%$ ) in der Praxis seine Formstabilität verliert und bereits unter Eigengewicht zu fließen beginnt. Dieses Verhalten kann mit rheologischen Messungen nicht abgebildet werden, weshalb ein neuartiger Messaufbau entwickelt wird, um das Fließverhalten von Hydrogelen nach dem Druck genauer zu erfassen. Dabei wird der Hydrogelstrang während des Druckvorgangs von oben gefilmt und die zeitliche Änderung des Durchmessers analysiert. Eine wichtige Voraussetzung für dieses neue Messverfahren ist die Verwendung einheitlicher Druckbedingungen. Aus diesem Grund wird der Parameter  $\kappa$  eingeführt, der sich aus dem Quotienten von Durchsatz und Druckgeschwindigkeit bildet und eine theoretische Querschnittsfläche des Strangs beschreibt. Durch die Verwendung von  $\kappa$  sind die Druckergebnisse unabhängig von den verwendeten Prozessparametern vergleichbar und übertragbar. Die aus diesen Versuchen gewonnenen Daten wurden zusammen mit den rheologischen Kennwerten in einem neuen Modell zur Beschreibung des Fließverhaltens zusammengefasst. Die Validierung des vorgestellten Modells zeigt eine gute Übereinstimmung der vorhergesagten Werte mit den Daten aus den praktischen Druckversuchen und kann somit als systematischer Ansatz zur Bestimmung der Druckbarkeit von Biotinten verwendet werden.

Im dritten Teil wird gezeigt, dass eine gezielte Biofunktionalisierung mit Kollagen zu einer signifikanten Verbesserung der Zellviabilität von kultivierten humanen BJ-Fibroblasten auf PCL-Faserfragmenten führt. Weitere Zellkulturversuche mit verschiedenen Zelltypen zeigen eine ausgeprägte Interaktion mit den PCL-Fasern. Im Medium können die Zellen gut an den Fasern adhären und werden durch diese in ihrer Migrationsrichtung beeinflusst. Um eine Schädigung der Zellmembran während des Druckprozesses zu vermeiden, sollten die Zellen erst kurz vor dem Druck mit den Fasern gemischt werden. Die Adhäsion und Proliferation der untersuchten Zelltypen auf den Fasern hängt darüber hinaus stark von der Fasermorphologie ab. Während sich die Zellen auf hantelförmigen Fragmenten gut ausbreiten und proliferieren, zeigen sie auf Endlofasern eine kugelige Form. Der Einfluss der Fasermorphologie auf die Zelladhäsion und -migration wird mithilfe eines Modells dargestellt. Demnach begünstigt der sanfte Krümmungsgradient der hantelförmigen PCL-Mikrofasern die Bildung von fokalen Adhäsionen und führt zu einer verstärkten Integrinbindung im Vergleich zu Endlofasern.

# Summary

The 'extended decision solution' for organ donation, which is currently in force in Germany, leads to long waiting lists for donor organs and 780 patients, who died in 2020 alone while waiting for a donor organ. On average, there are twice as many patients on the waiting lists as there are transplant procedures that can be performed each year. Neither the introduction of donor chains nor advances in xenotransplantation have yet been able to meet this demand. For this reason, intensive work is being done on the development of tissue engineering and, in particular, biofabrication, which holds the promise to produce organs from the patient's own body cells (autologous process) with the aid of bioprinting in a 3D printing process.

The various printing methods for the biofabrication of organs are constantly being improved, with extrusion-based printing currently being the most commonly used technique. This process operates within the so-called biofabrication window, a compromise between resolution and cell viability. In order to shift this process window further in the direction of higher resolution and simultaneously high cell survival, the use of additives, especially fibers, have come into focus of the scientific community. Fibers can be introduced into the hydrogel as an additional hierarchical element to improve the shape stability and give the cells an attractive surface for adhesion and alignment.

The present work is therefore divided into three parts. While the first part presents the design and fabrication of fiber fragments with novel morphologies, the other two sections describe their influence on the printing behavior of hydrogels and the effects on the interaction with different cell types.

The novel fiber fragments developed in this work are based on the polymer polycaprolactone (PCL), which is approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) as an implant material. It can be processed into fibers by both electrostatic solution spinning (electrospinning) and electrostatic melt spinning (MEW). For electrospinning, a process window is identified in which a previously undescribed morphology of dumbbell-shaped fiber fragments can be continuously generated. The formation of this novel morphology is explained in this work by a model that identifies entropy-elastic creep after fiber impact on

the collector as a crucial factor for fragmentation. By varying the concentration (10-30 %) and molecular weight fractions (10/45/80 kDa) of PCL, the resulting morphology can be influenced in a controlled manner within a limited range. The largest aspect ratios of fragments above 20 can only be obtained with mixtures of the extreme molecular weight fractions (10/80 kDa) at concentrations around 25 % w/v and a mixing ratio of 8:2.

A similar fragmentation process can be observed when processing PCL with MEW. However, the melting temperature, the ambient temperature, and the surface condition of the specially fabricated collector are critical factors. Photolithography is used to create ridges of varying width and increasing spacing on the collector. By varying the ridge width, the aspect ratio of the resulting fragments can be precisely controlled, while the ridge spacing influences the morphology of the rounded ends. A larger ridge spacing results in thickened spherical ends relative to the fiber diameter, until a maximum value of this ratio of about 1.5 is reached at 85  $\mu\text{m}$  ridge spacing.

In the second part of this work, the PCL fiber fragments described above are mixed with hydrogels to determine their effect on printability properties. Since there is no broad consensus in the literature on the definition of printability, own methods are developed. Taking into account the most commonly used rheological tests, a new measurement protocol is developed to ensure high information density in a short time (40 min) and with low material consumption (200  $\mu\text{l}$ ) per measurement cycle. For the rheological tests, cellulose nanofibers (CeNF) are used as a reference system and both fiber systems are tested in three different concentrations with hydrogels based on alginate, Pluronic and recombinant spider silk protein (eADF4(C16)). The incorporation of both fiber systems into the hydrogels results in an increase in complex viscosities and an increase in power-law flow coefficients, while the shear thinning behavior is not affected. Thus, both systems improve the rheological properties, but PCL fragments must be used at much higher concentrations than CeNF to achieve comparable effects due to their lower active surface area. Through the application of rheological models, such as the integrated Burgers model, the viscosity of the Maxwell element dashpot  $\eta_1$  can be determined as the most important parameter influenced by the fiber systems on the rheological behavior of the hydrogels.

However, printing tests show that in practice the Pluronic-based hydrogel loses its dimensional stability at a critical concentration of PCL fragments ( $> 5\%$ ) and starts to flow under its own weight. This behavior can not be captured by rheological measurements, so a novel measurement setup is developed to more accurately capture the flow behavior of hydrogels after printing. The hydrogel strand is filmed from above during the printing process and the change in diameter over time is analyzed. An important prerequisite for this new measurement method is the application of uniform printing conditions. For this reason, the parameter  $\kappa$  is introduced, which is the quotient of throughput and printing

speed and describes a theoretical cross-sectional area of the strand. By using  $\kappa$ , printing results can be compared and made transferable regardless of the process parameters used. The data obtained from these experiments are combined with the rheological parameters in a new model to describe the flow behavior. The validation of the presented model shows a good agreement of the predicted values with the data from the practical printing tests and can thus be used as a systematic approach to determine the printability of bioinks.

In the third part, it is shown that targeted biofunctionalization with collagen leads to a significant improvement in cell viability of cultured human BJ fibroblasts on PCL fiber fragments. Further cell culture experiments with different cell types show pronounced interaction with the PCL fibers. In the medium, the cells can adhere well to the fibers and are influenced by them in their direction of migration. To avoid damage to the cell membrane during the printing process, it is recommended to mix the cells with the fibers just before printing. The adhesion and proliferation of the investigated cell types on the fibers is strongly dependent on the fiber morphology. While the cells spread and proliferate well on dumbbell-shaped fragments, they show a spherical shape on continuous fibers. A model is presented to describe the influence of fiber morphology on cell adhesion and migration. According to this model, the gentle curvature gradient of dumbbell-shaped PCL microfibers favors the formation of focal adhesions and leads to enhanced integrin binding compared to continuous fibers.

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Aktueller Stand der Organtransplantation

Die letzte Debatte um eine Widerspruchslösung bei der Organspende wurde in Deutschland im Jahr 2019 geführt und im Januar 2020 im Deutschen Bundestag mit 56,23% Gegenstimmen abgelehnt.[1] Im Falle einer solchen Widerspruchslösung wäre jeder Mensch potenzieller Organspender, bis er dagegen aktiv widerspricht. So ist Deutschland allerdings weiterhin Mitglied einer Gruppe von Ländern in denen eine „erweiterte Zustimmungslösung“ oder „Entscheidungslösung“ gilt. In dieser Form müssen Spender zu Lebzeiten aktiv eine willentliche Erklärung zur ihrer Spendenbereitschaft, etwa in Form eines Organspendeausweises, abgeben. Andernfalls wird die Entscheidung post mortem von nahen Angehörigen nach dem mutmaßlichem Willen des Verstorbenen getroffen.

Dies führt zu einer enormen Diskrepanz zwischen den seit Jahren statistisch erhobenen Zustimmungsraten in der Bevölkerung von über 80% für die Organspende und den knapp 40% an Erwachsenen in Deutschland, die tatsächlich einen Organspendeausweis besitzen.[2] Da die meisten Menschen im Laufe ihres Lebens allerdings nie eine dokumentierte Willenserklärung dazu abgeben, entsteht ein stark verzerrtes Bild in der öffentlichen Debatte. Die bisherigen Kampagnen (siehe Abbildung 1.1) zur Steigerung der Spenderzahlen und die damit verbundenen Gesetzesänderungen führten in den letzten Jahrzehnten allerdings nicht zu einer signifikanten Steigerung dieser Zahlen.[3] Eines der Kernprobleme wird in der effektiven Aufklärung der Bevölkerung gesehen. Die Hauptverantwortung liegt in diesem System bei den Hausärzten, welchen jedoch bei der Unterbesetzung an Hausarztpraxen insbesondere auf dem Land, nur eingeschränkt Zeit für intensive Beratungsgespräche mit jedem einzelnen Patienten zur Verfügung steht.

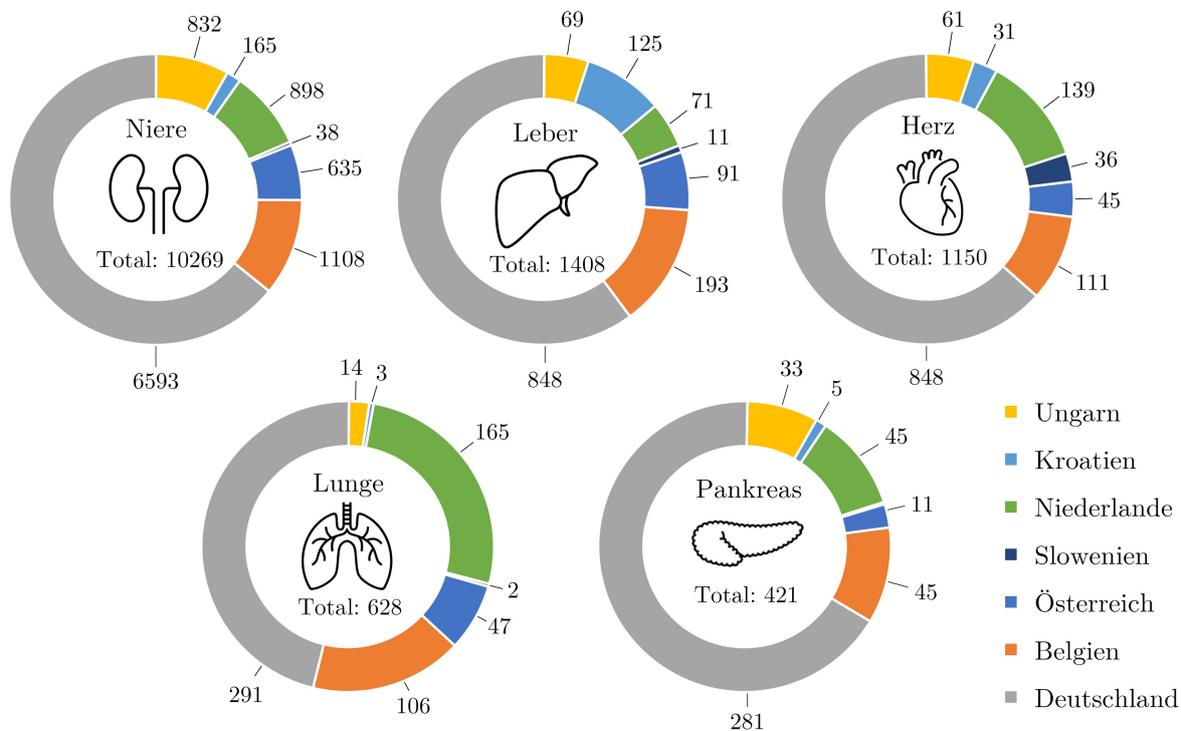
## Einleitung



**Abbildung 1.1:** Reihe oben: Plakatmotive der öffentlichen Kampagne für den Organspendeausweis. Unten: Vorder- und Rückseite eines Organspendeausweises, wie er auf der Homepage der Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung (BZgA) heruntergeladen oder bestellt werden kann.[2]

Ein Blick auf die Wartelisten für Spenderorgane zeigt jedoch wie bedeutend dieses Problem für unser Gesundheitssystem inzwischen ist.[4] So liegt die Zahl der Patienten auf Wartelisten, nach Abbildung 1.2 für den Raum von Eurotransplant, seit Jahren deutlich über der Zahl an gespendeten Organen, was zu immer längeren Wartezeiten führt. Allein im Jahr 2020 haben in Deutschland 3384 Patienten ein implantiertes Organ erhalten, im selben Zeitraum sind allerdings auch 5461 neue Patienten auf die Wartelisten gekommen und 780 davon verstorben.[3] Im Schnitt übersteigt die Zahl der Patienten auf der Warteliste die Anzahl an Transplantationen mindestens um den Faktor zwei, während im Fall der Niere sogar mehr als der fünffache Bedarf an Spenderorganen vorhanden ist. [5] Weltweit starben im Jahr 2020 über 22000 Menschen die dokumentiert auf Wartelisten für Organe standen, die Dunkelziffer wird dabei noch deutlich höher eingeschätzt.[5] Zusätzlich gibt es eine nicht offiziell erfasste Zahl an Patienten, deren Gesundheitszustand

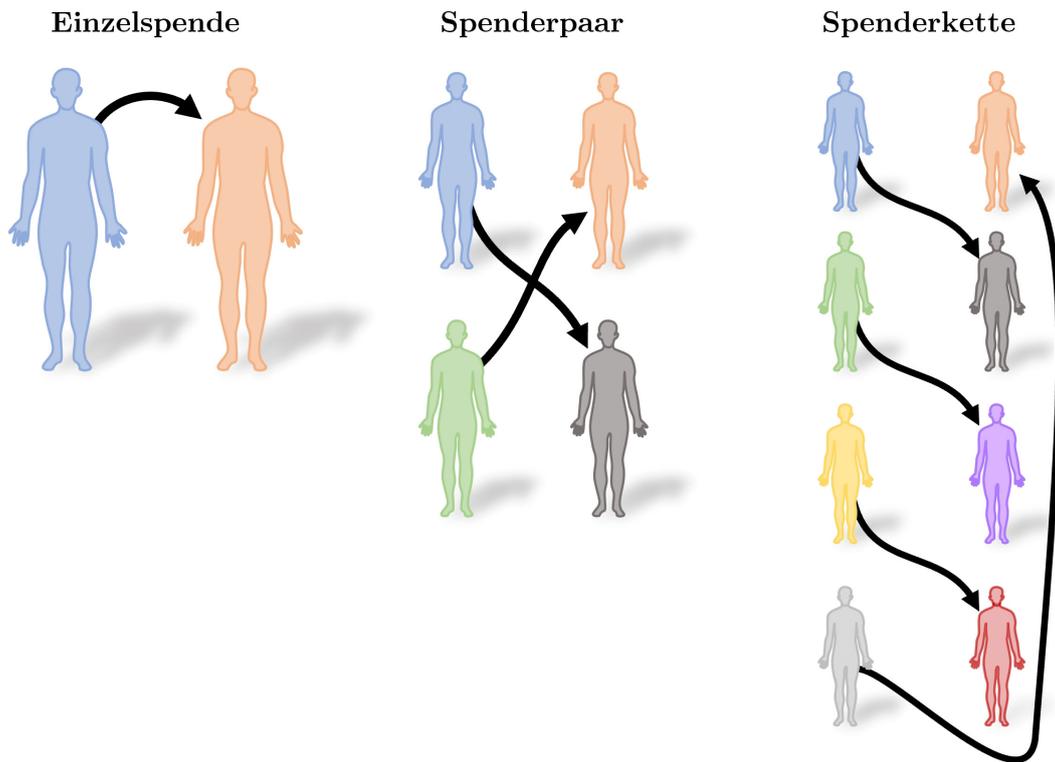
sich während der Wartezeit deutlich verschlechtert, dass sie für eine Transplantation nicht mehr in Frage kommen und von der Liste genommen werden. Die COVID-19 Pandemie hat diese Probleme zusätzlich verschärft. Im weltweiten Vergleich wurde im Jahr 2020 ein Rückgang an Transplantationen von 18% gegenüber 2019 verzeichnet.[6]



**Abbildung 1.2:** Aktive Warteliste für die Organe Niere, Leber, Herz, Lunge und Pankreas nach Daten des Eurotransplant-Raumes im Jahr 2021.[7]

An diesen Zahlen wird deutlich, dass auch eine Widerspruchslösung lediglich einen Teil zur Lösung beitragen kann, das Problem aber nicht allein beheben kann. So stehen selbst in Spanien, dem europäischen Spitzenreiter bei Organtransplantation mit 40 gespendeten Organen pro 1 Mio. Einwohner (im Vergleich dazu liegt Deutschland bei 10 Organen pro 1 Mio. Einwohner), mit 4315 Transplantationen weiterhin 9498 Patienten auf Wartelisten gegenüber, wobei weitere knapp 28000 Nierenpatienten im Jahr 2020 dialysiert wurden.[5, 8] Und dies, obwohl in Spanien eine Widerspruchslösung im Gesetz verankert ist. In allen Ländern dieser Welt steht die Niere damit unangefochten auf Platz eins der am häufigsten gespendeten und gleichzeitig benötigten Organe. Da jeder gesunde Mensch zwei Nieren besitzt ist dieses Organ besonders stark im Fokus, wenn es um die Lebendspende geht. Trotz dieser günstigen Voraussetzungen sind immer noch deutlich zu wenig Spendernieren verfügbar, um den Bedarf zu decken. Häufig lassen sich nahe Angehörige als Spender gewinnen, jedoch sind diese in vielen Fällen aufgrund der Blutgruppe oder Histokompatibilität nicht mit dem Patienten kompatibel. Dies hat, dargestellt in Abbildung 1.3, in den letzten Jahren zur Entwicklung von immer komplexeren Systemen wie

gepaarten Spendern und Spenderketten geführt, um den Patientenkreis zu erweitern.



**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung der Systeme Einzelspende, Spenderpaare und Spenderketten am Beispiel der Nierentransplantation.

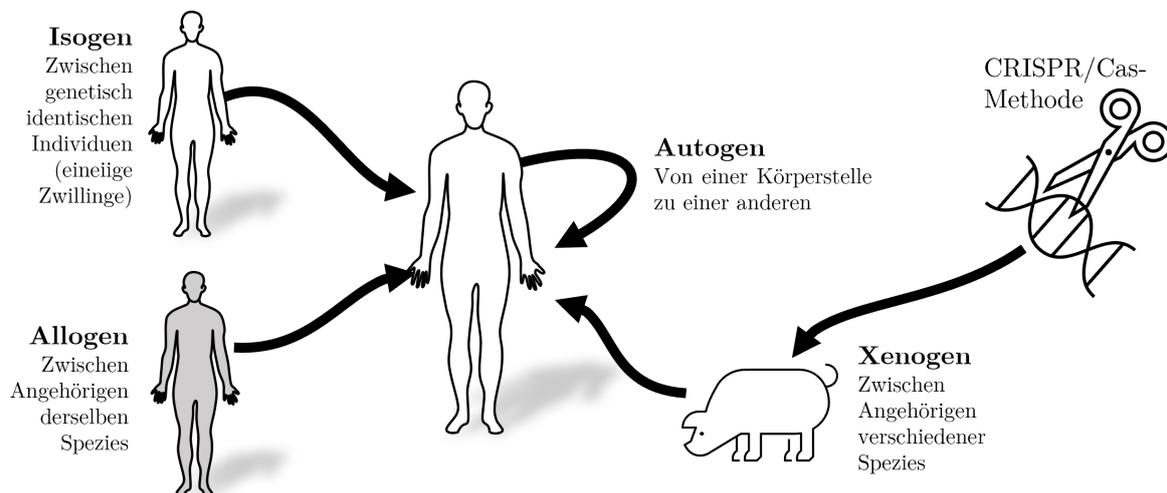
Bei gepaarten Spendern sucht das medizinische Team bei einer Inkompatibilität zwischen potenziellem Spender und Empfänger nach einem zweiten Paar.[9] Wenn das Spenderorgan von Spender B nun eine höhere Kompatibilität mit Patient A aufweist und gleichzeitig das Organ von Spender A besser zu Patient B passt, werden die Betroffenen in den Entscheidungsprozess involviert und können ihre Zustimmung geben. Bei einer Spenderkette wird dieser Ansatz einen Schritt weitergedacht und innerhalb der Spender- und Patientendatenbanken diejenigen Paare mit der höchsten Kompatibilität ermittelt.[10] Diese Ansätze bieten das Potenzial die Anzahl an kompatiblen Organen für Patienten deutlich zu erhöhen, da sich der Kreis an potenziellen Spendern erweitert. Gleichzeitig ist diese Form der Organspende allerdings hoch komplex, da bereits im ersten Schritt die Zustimmung einer größeren Anzahl von Personen notwendig ist, was intensive Gespräche und Aufklärung voraussetzt. Im zweiten Schritt müssen die Eingriffe zeitlich und räumlich genauestens koordiniert werden, wobei die Toleranz für unvorhergesehene Komplikationen stark eingeschränkt wird.

Im Jahr 2015 wurden beispielsweise nach dem System einer Spenderkette neun Nierentransplantationen mit 18 beteiligten Spendern und Patienten parallel im Universitätsklinikum San Francisco Medical Center und dem California Pacific Medical Center erfolgreich

durchgeführt.[11] Der logistische Aufwand dahinter war allerdings enorm, da in diesem Fall bis zu 10 Chirurgen und mehr als 20 weitere Angestellte für die 36 Stunden Dauer der notwendigen Eingriffe abgestellt werden mussten. Noch komplizierter wird es, wenn Spender und Patienten sich nicht im selben Krankenhaus bzw. im selben Land befinden, wie das Beispiel einer Spenderkette zwischen Israel und den Vereinigten Arabischen Emiraten aus dem Jahr 2021 zeigt. In diesem Fall mussten die Operationen von zwei Spendern und Patienten in Tel Aviv und Haifa, mit den Operationen einer Spenderin und Patientin in Abu Dhabi zusätzlich mit den Flugzeiten abgestimmt werden, um die Transportzeit der Organe so gering wie möglich zu halten.[12] Im Zuge dieser Entwicklung wird immer wieder die Etablierung einer weltweiten Plattform für Nierentransplantation vorgeschlagen, die Umsetzung ist allerdings hoch komplex und setzt ein weltweit agierendes Netzwerk voraus, das erst noch geschaffen werden muss.[13]

## 1.2 Xenotransplantation

Ein Ansatz den Mangel an Spenderorganen zu reduzieren, liegt in den Fortschritten der Xenotransplantation.[14–16] Bei dieser Methode werden Organtransplantationen Artübergreifend (Abbildung 1.4) durchgeführt. Seit den 2020er Jahren erregen dabei neue Ergebnisse zur Transplantation von Nieren, Lungen und Herzen aus genetisch modifizierten Schweinen in Affen Aufsehen.[17–19]



**Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung der verschiedenen Ursprünge von transplantiertem Gewebe und Organen.

Der bis dato größte Erfolg in dieser Disziplin ist die Transplantation einer solchen Niere in eine hirntote menschliche Patientin.[20–22] Die Niere begann zwar direkt nach der Transplantation Urin zu produzieren, da dieser Versuch jedoch nur 54 Stunden dauerte, können

keine weiteren Aussagen über mittel- bis langfristige Funktionsfähigkeit des Organs und etwaige verzögerte Immunreaktionen getroffen werden. Die größte Hürde stellt bei diesen Versuchen die hohe Wahrscheinlichkeit einer akuten immunologischen Abstoßungsreaktion zwischen menschlichem und tierischem Gewebe dar. Mit Hilfe von Genmodifikationen auf Grundlage der Entwicklung der CRISPR/Cas-Methode konnten hier in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte erzielt werden.[20, 23, 24]

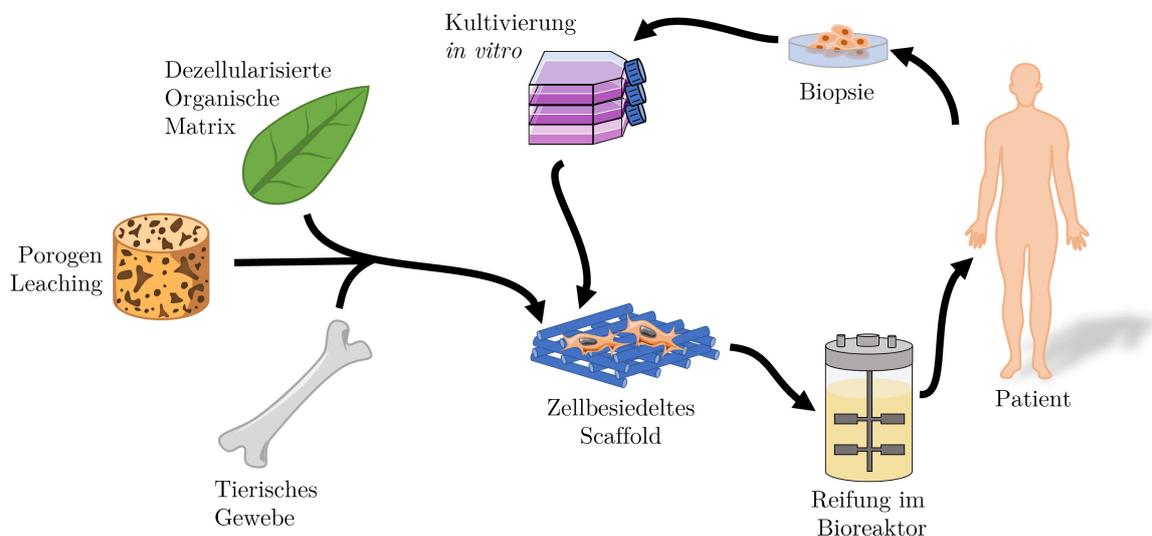
Dafür werden die als Spender geplanten Tiere genetisch mehrfach modifiziert und unter Laborbedingungen herangezüchtet bis die Zielorgane ausgewachsen sind. Die genetischen Modifikationen haben zum einen das Ziel die Oberflächenrezeptoren des zu transplantierenden tierischen Gewebes so zu verändern, dass sie den menschlichen Zellen ähneln. Auf der anderen Seite wird versucht, das Organwachstum zu steuern, um die gewünschte finale Größe ohne weiteres unkontrolliertes Wachstum nach der Transplantation zu erreichen. Ein bislang einzigartiges Beispiel für diese Entwicklungen ist das von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) zugelassene Schwein „GalSafe“ der Firma Revivacor aus den USA. In diesen Tieren wurden 10 Genmodifikationen vorgenommen, um es für Transplantationen im Menschen kompatibler zu machen.[23] Der Namensgebende Zucker Galaktose- $\alpha$ -1,3-Galaktose (kurz AlphaGal) wird für einen Großteil der akuten Immunabstoßungsreaktionen verantwortlich gemacht, daher wurden drei Gene, die mit diesem in Zusammenhang stehen, stumm geschaltet.[25] Damit wurde erreicht, dass Organgewebe dieser Tiere keine nachweisbaren Mengen an AlphaGal mehr aufweisen. Ein weiteres Gen, verantwortlich für die Produktion von Wachstumsfaktoren, wurde stumm geschaltet, um das beobachtete übermäßige Wachstum von Schweineorganen in Primaten zu unterbinden. Die restlichen sechs Modifikationen sind menschliche Gene, die eingefügt wurden, um die Abstoßungsreaktion zu unterbinden, Entzündungen vorzubeugen und die Entstehung von Blutgerinnseln zu verhindern. Neben den bereits beschriebenen Versuchen mit Nieren von Revivacor (USA) arbeiten auch Firmen wie Qihan Bio (China) und eGenesis (USA) aktuell daran in Zukunft ebenfalls genmodifizierte Herzen und Lungen für menschliche Patienten anbieten zu können.

Diese Technik bietet bei weiterer Entwicklung das Potenzial größere Mengen an Organen zur Verfügung zu stellen, da genveränderte Tiere in kontrollierten Laborumgebungen in größerem Maßstab gezüchtet werden könnten. Kritisch betrachtet werden sollten in diesem Zusammenhang allerdings Gefahren wie die Übertragung von Zoonosen und die fehlenden Langzeiterfahrungen in Bezug auf Zuverlässigkeit und Funktionalität der so gewonnenen Organe.[26] Daneben wird der Ruf nach einer ethischen Debatte über das Züchten von Tieren als Organspender für Menschen immer wieder laut.[27–33] Größter Kritikpunkt ist hierbei die Verwendung von Tieren als „Ersatzteillager“ des Menschen. Darüber hinaus ist die Haltung von genmodifizierten Tieren unter Laborbedingungen aktuell nicht mit einer artgerechten Haltung im Sinne des Tierwohls vereinbar. Im wissenschaftlichen Konsens

wird die Xenotransplantation daher aktuell als Übergangslösung betrachtet bis weitere Möglichkeiten zur Verfügung stehen oder als schnelle Überbrückung kritischer Zustände bei Tansplantationspatienten.[34]

### 1.3 Regenerative Medizin und Tissue Engineering

Aus dieser Problematik heraus formte sich in den 1980er Jahren das Forschungsfeld des Tissue Engineering als Teildisziplin der regenerativen Medizin.[35] Diese relativ junge Wissenschaft hat sich zum Ziel gesetzt „Prinzipien und Methoden der Ingenieur-, Werkstoff- und Lebenswissenschaften zur Gewinnung eines fundamentalen Verständnisses von Struktur-Funktions-Beziehungen in normalen und pathologischen Säugergeweben; und zur Entwicklung von biologischem Ersatz zur Erneuerung, Bewahrung oder Verbesserung der Gewebefunktion“ anzuwenden.[35] Die maßgeblichen Schritte (Abb. 1.5) sind dabei die Entnahme von Gewebe des Patienten per Biopsie, die Kultivierung der gewonnenen Zellen *in vitro* und die Ansiedelung dieser Zellen auf Gerüsten (sog. Scaffolds). Anschließend reifen die besiedelten Konstrukte bis zur Ausbildung von funktionalem Gewebe in einem Bioreaktor, bevor diese wieder dem Patienten implantiert werden.



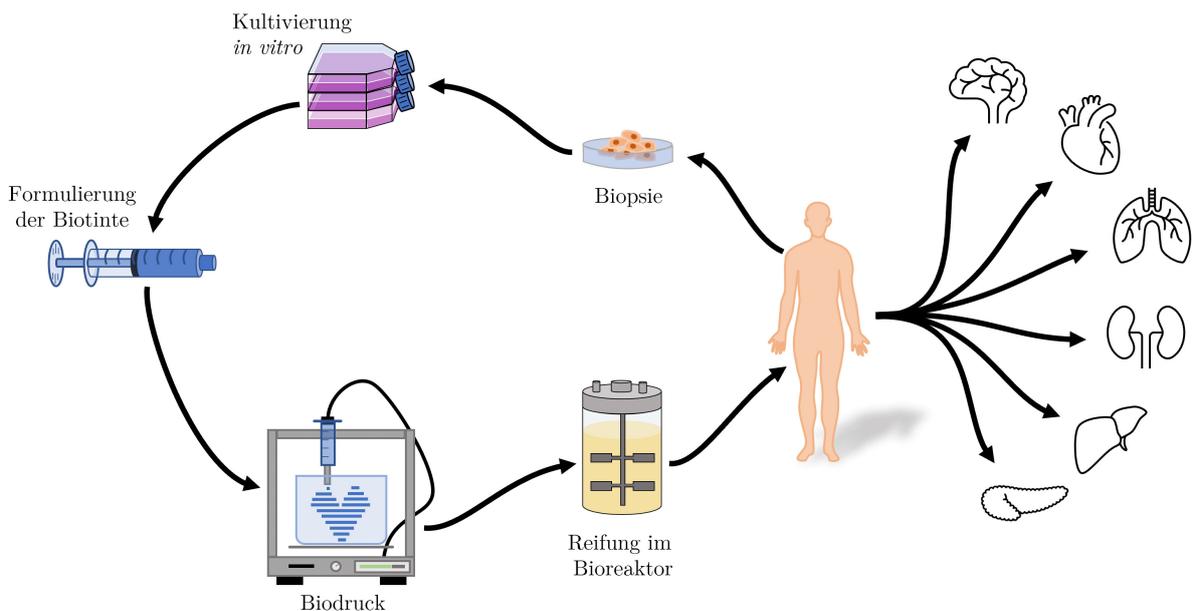
**Abbildung 1.5:** Schematische Darstellung der Ansätze des Tissue Engineering und der Regenerativen Medizin.

Durch die Verwendung körpereigener Zellen des Patienten kann das zentrale Problem der akuten immunologischen Abstoßung und der lebenslangen Gabe von Immunsuppressiva effektiv umgangen werden. In der Theorie bietet dieser Ansatz daher den Zugang zu beliebig vielen Organen für jeden Patienten mit maximaler Kompatibilität. In der Praxis stößt das Konzept der Verwendung vorgefertigter Scaffolds aus unterschiedlichsten Materialien

(u. a. dezellularisiertes organisches Material, künstliche hierarchische Konstrukte, etc.) bei der anschließenden Besiedelung durch die kultivierten Zellen an seine Grenzen.[36] Bereits bei der Herstellung von Strukturen in der Dimension von Zentimetern findet eine Limitierung durch die Reichweite der Zellmigration und die Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff in das Innere des Scaffolds statt. Die fehlende Vaskularisierung unterbindet anschließend die vollständige Infusion des Konstrukts mit Zellen und verhindert die Ausbildung von komplexen funktionalen Gewebestrukturen im gesamten Volumen. Nach anfänglichen Erfolgen und klinischen Produkten in diesem Forschungsfeld [37] kam es in den 2000ern durch die genannten Probleme zu einer Stagnation, da entscheidende Durchbrüche in der Verbesserung der Zellbesiedelung der Gerüste ausblieben.[38, 39]

## 1.4 Biofabrikation

Eine Lehre aus diesem Dilemma wird in der daraus hervorgegangenen Disziplin der Biofabrikation gezogen (Abb. 1.6). Dieser Ansatz definiert sich nach Groll et. al [40], als die „automatisierte Herstellung von biofunktionalen Produkten mit struktureller Organisation von lebenden Zellen, bioaktiven Molekülen, Biomaterialien, Zellaggregaten wie Mikrogewebe, oder hybriden Zell-Material Konstrukten, durch Biodruck oder Bioassemblierung und nachfolgende Gewebereifungsprozesse“. Die grundlegende Weiterentwicklung ist die direkte Integration von Zellen in das Material zur Herstellung des Konstrukts, was eine präzise räumliche Anordnung und Verteilung der Zellen im gesamten Volumen ermöglicht.



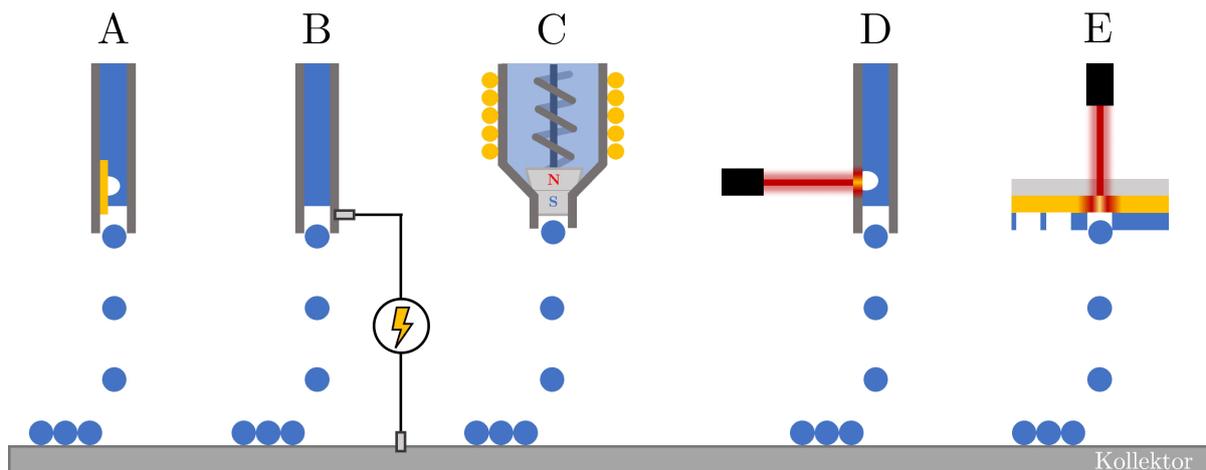
**Abbildung 1.6:** Schematische Darstellung des Ansatzes der Biofabrikation.

## 1.5 Biodruckverfahren

Für die Prozessierung des zellbeladenen Materials im Sinne der Biofabrikation (sogenannte Biotinten) stehen eine Reihe von 3D-Druckverfahren zur Verfügung. Diese unterscheiden sich grundlegend in der Dimension der Inkremente, aus denen das finale Konstrukt zusammengesetzt ist. Sie können unter vier Oberbegriffen zusammengefasst werden: Tropfendruck, Strangdruck, Flächendruck und Volumendruck.

### 1.5.1 Tropfendruck

Zu den tropfengenerierenden Verfahren zählen der Tintenstrahldruck (Inkjet), laserinduziertes Drucken, Mikroventildruck und akustisches Drucken (Abb. 1.7).[41] Die Viskosität für Inkjet kompatible Biotinten liegt im Bereich von 3-12 mPa·s, während für laserinduzierte Verfahren 1-300 mPa·s möglich sind.[42]



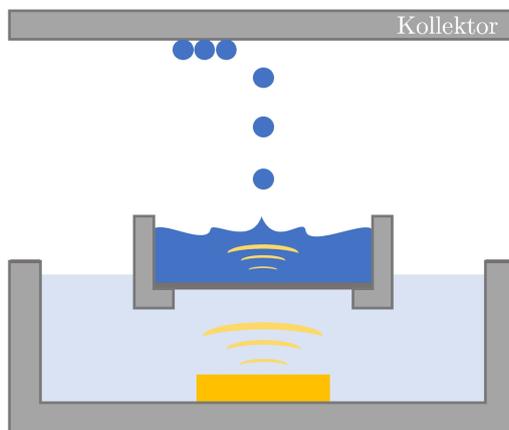
**Abbildung 1.7:** Schematische Darstellung der Tropfendruckverfahren (A) Inkjet mit mechanischem/thermischem Aktuator, (B) Inkjet im elektrostatischen Feld, (C) Mikroventildruck, (D) Laser Induced Side Transfer (LIST) und (E) laserbasierter Vorwärtstransfer (LIFT/MAPLE).

Für den Tintenstrahldruck von Biotinten wird dieselbe Technik wie beim Druck von Toner auf Papier verwendet.[43] Die Biotinte befindet sich in einer Kartusche, die mit einer Kapillare verbunden ist. Durch einen Aktuator wird über ein piezoelektrisches Element ein Schallimpuls an die Tinte in der Kapillare abgegeben oder ein Heizelement sorgt für ein augenblickliches Verdampfen eines kleinen Teils der Tinte und verursacht dadurch eine Druckwelle. Alternativ wird ein elektrostatisches Feld angelegt, welches die Biotinte elektrisch auflädt und beschleunigt. In allen drei Fällen führt der eingebrachte Impuls zur Erzeugung eines Tropfens aus der Kapillare, welcher dem Kollektor entgegenfliegt.

Im Mikroventildruck wird Biotinte aus einer Kartusche durch eine Kapillare geleitet, die mit Druckluft versorgt wird. Die Öffnung der Kapillare ist zu Beginn mit einem Kolben blockiert. Das kurzzeitige Anlegen einer elektrischen Spannung führt zur Kontraktion einer Feder, welche mit dem Kolben im Inneren der Kapillare verbunden ist. Durch das Heben des Kolbens kann die Tinte daran vorbei in den vordersten Teil der Kapillare fließen. Beim anschließenden Zurückschnellen des Kolbens durch Entspannung der Feder wird das Material beschleunigt und als Tropfen in Richtung Kollektor befördert.

Beim LIST-Verfahren (Laser Induced Side Transfer) wird ein Impuls eines Niedrigenergie-lasers verwendet, um eine transiente Mikroblase am Ende einer mit Biotinte beladenen Kapillare aus Glas zu erzeugen. Durch Ausdehnung und Kollaps der Gasblase wird eine Schockwelle ausgelöst, die zur Ausstoßung eines Tropfens im rechten Winkel zur Anregungsachse führt.[44] Im Falle der laserinduzierten Druckverfahren LIFT (Laser Induced Forward Transfer)[45], AFA-LIFT (Absorbing Film Assisted-LIFT)[46] und MAPLE-DW (Matrix-assisted Pulsed Laser Evaporation Direct Writing) [47, 48] ist die Biotinte als unterste von drei Schichten auf einem Trägerband aufgebracht.[45] Die Trägerschicht besteht aus einem mechanisch stabilen aber für die Wellenlänge des Lasers durchlässigen Material wie Glas oder Quartz. In der mittleren Schicht befindet sich je nach Methode eine stabile Metallschicht (LIFT), eine metallene Opferschicht (AFA-LIFT) oder eine Opferschicht aus Biopolymeren (MAPLE-DW). Ein kurzer Impuls eines Hoch- (LIFT/AFA-LIFT) oder Niedrigenergie-Lasers (MAPLE-DW) erhitzt die mittlere Schicht punktuell in sehr kurzer Zeit. Die erzeugte Hitze führt zum Verdampfen des Hydrogels an dieser Stelle auf der anderen Seite. Die Ausdehnung der Gasblase löst einen Tropfen Biotinte aus der Oberfläche und schleudert ihn dem Kollektor entgegen.

Das akustische Drucken basiert auf einem ringförmigen Piezokristall, der ein Ultraschallfeld erzeugt, welches über eine Membran in das darüberliegende, nach oben offene Tintenreservoir übertragen wird (Abb. 1.8).[49]



**Abbildung 1.8:** Schematische Darstellung des akustischen Druckverfahrens.

Die Energie der Ultraschallwellen induziert einen akustischen Strömungseffekt und damit eine Bewegung der Tinte in Richtung der Flüssigkeitsoberfläche. Infolgedessen wölbt sich die Oberfläche bis die kinetische Energie der Teilchen der Flüssigkeit die Oberflächenspannung überschreitet und Rayleigh-Taylor-Instabilitäten zur Entstehung eines Tropfens führen. Dieser fliegt dem darüber positionierten, beweglichen Kollektor entgegen und adhäriert an dessen Oberfläche. Die Größe der erzeugten Tropfen ist dabei indirekt proportional zur verwendeten Anregungsfrequenz.

Alle Verfahren zum Tropfendruck bieten den Vorteil einer hohen Präzision, einige dieser Verfahren erlauben zusätzlich die Tropfengröße exakt zu steuern. Die Mechanismen zur präzisen Positionierung der Tropfen auf dem Kollektor sind seit Jahrzehnten in industriellen Anwendungen etabliert und zeichnen sich durch hohe Verlässlichkeit aus. Je nach Größe der erzeugten Tropfen ist dabei eine sehr hohe Auflösung bis hin zur Ablage einzelner Zellen möglich.[50]

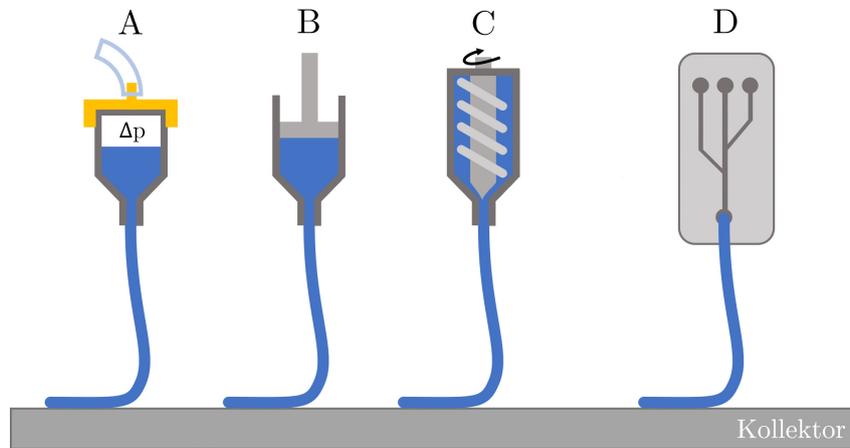
Ein Flaschenhals dieser Methode ist die geringe Geschwindigkeit in der Prozessierung größerer Flächen und die limitierte Möglichkeit dreidimensionale Strukturen aufzubauen. Dazu kommen zum Teil hohe thermische Belastungen und Scherkräfte, die bei der Tropfenerzeugung auf die Zellen wirken. Bei den laserinduzierten Methoden ist darüber hinaus die potenzielle Zelltoxizität von gelösten Metallionen aus der Opferschicht kritisch zu betrachten.

## **1.5.2 Strangdruck**

Zu den Strangdruckverfahren zählt das klassische Extrusionsdrucken, welches entweder pneumatisch oder mechanisch gesteuert wird, sowie das mikrofluidische Drucken (Abb. 1.9).[51] Die Viskosität kompatibler Biotinten liegt im Bereich von 30 mPas bis zu  $6 \times 10^7$  mPa·s.[42] Im Falle des klassischen Extrusionsdrucks befindet sich die Biotinte in einer Kartusche im Inneren des beweglichen Druckkopfs, welche mit einer Kapillare ausgestattet ist. Diese führt das Material während der Extrusion auf den Kollektor. Die Biotinte wird durch Anlegen von Druckluft (pneumatisch) oder direkt mechanisch durch einen sich bewegenden Kolben bzw. eine rotierende Förderschnecke aus der Kartusche durch die Kapillare befördert.[52] Der pneumatische Ansatz gewährleistet dabei einen konstanten Druck während die mechanische Extrusion für einen konstanten Volumenstrom sorgt.[51]

Eine Sonderform des Extrusionsdrucks ist das mikrofluidische Drucken. Bei diesem Ansatz steht ein sogenannter mikrofluidischer Chip im Mittelpunkt. Dieser Chip hat beliebig viele Ein- und Ausgänge für Flüssigkeiten, wobei sein Inneres durchzogen ist von einem System aus miteinander verbundenen Kanälen im Maßstab von Mikrometern. Dieser Auf-

bau erlaubt ein hohes Maß an Kontrolle über die Fließbedingungen innerhalb der Kanäle und ermöglicht ein präzises Mischen unterschiedlicher Polymere und den entsprechenden Vernetzern. Im Hinblick auf die Anzahl gleichzeitig prozessierbarer Materialien und die Herstellung von Gradientenstrukturen bieten diese Systeme maximale Flexibilität.[53]



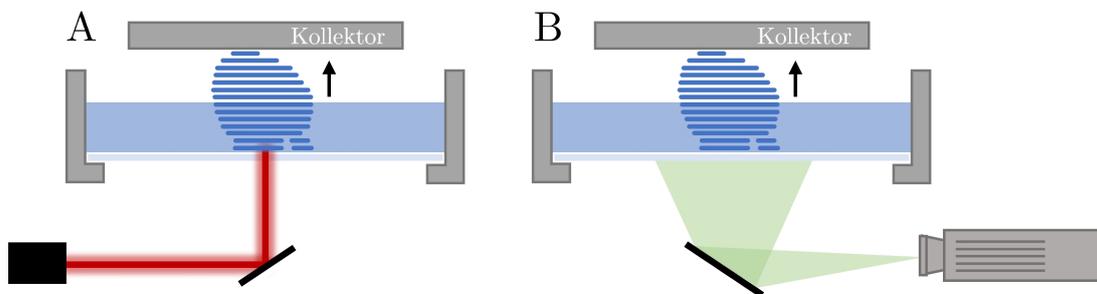
**Abbildung 1.9:** Schematische Darstellung der Strangdruckverfahren (A) pneumatische Extrusion, (B) direkte Extrusion per Kolben oder (C) Schneckenextruder und das (D) mikrofluidische Drucken.

Die Strangdruckverfahren zeichnen sich durch hohe Flexibilität in der Auswahl der Materialien und die Möglichkeit zur Verwendung verschiedenster Biotinten in einem kontinuierlichen Prozess aus. Zugleich ermöglichen klassische Extrusionsverfahren die Herstellung von klinisch relevanten 3D-Konstrukten innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden. Darüber hinaus sind diese Geräte preisgünstig und vergleichsweise einfach in der Bedienung.

Nachteilig ist gerade beim mikrofluidischen Drucken aufgrund der Mikrokänae eine sehr begrenzte Durchsatzrate und damit lange Druckzeiten. Zusätzlich sind mikrofluidische Chips anfällig gegenüber Verstopfung und damit wenig robust im kontinuierlichen Einsatz. Bei klassischen Extrusionsdruckern hängt die maximal erreichbare Auflösung vom Durchmesser der verwendeten Kapillaren ab. Da mit geringeren Kapillardurchmessern auch die Schichtdicke reduziert wird, führt dies in der Folge ebenfalls zu einem deutlichen Anstieg der Druckdauer. Gleichzeitig wachsen mit sinkendem Kapillardurchmesser die auftretenden Scherkräfte im inneren der Kapillare stark an. Dieser Scherstress wirkt sich negativ auf die Viabilität der verdruckten Zellen während und nach dem Druck aus.

### 1.5.3 Flächendruck

Zu den Flächendruckverfahren zählen der in Abbildung 1.10 dargestellte stereolithografische Druck (SLA) und das „Digital Light Processing“ (DLP). Beide Methoden haben einen sehr ähnlichen Aufbau.[54] Eine Kollektorplattform wird von oben in ein Bad aus flüssiger, fotovernetzbarer Biotinte getaucht. Unterhalb des Bads befindet sich eine Lichtquelle (Laser oder UV) mit einer aktiven Steuerungseinheit. Bei der SLA Methode wird ein einzelner Laserstrahl von einem beweglichen Spiegel gelenkt und damit alle Bereiche der ersten Schicht in einem Raster nacheinander belichtet. Durch die Belichtung bilden sich freie Radikale, die eine chemische Quervernetzung des Polymers zur Folge haben.[55] Ist die erste Schicht vollständig vernetzt und stabil, fährt der Kollektor um das Maß der Schichtdicke nach oben und der Vorgang wird wiederholt, bis die 3D-Struktur vollständig erzeugt ist.



**Abbildung 1.10:** Schematische Darstellung der Flächendruckverfahren (A) SLA und (B) DLP.

Das DLP funktioniert nach einem ähnlichen Prinzip, in diesem Fall wird für die Belichtung ein Raster aus beweglichen Mikrospiegeln verwendet, wobei jeder einzelne Spiegel einen Pixel der späteren Schicht repräsentiert. Wird nun das gesamte Raster an Mikrospiegeln belichtet, kann durch die An-/Aus-Stellung jedes einzelnen Spiegels ein Abbild der gesamten Schicht in einem Schritt auf den Kollektor projiziert werden. Der restliche Vorgang läuft simultan zum SLA bis die komplette dreidimensionale Struktur vernetzt ist.[54]

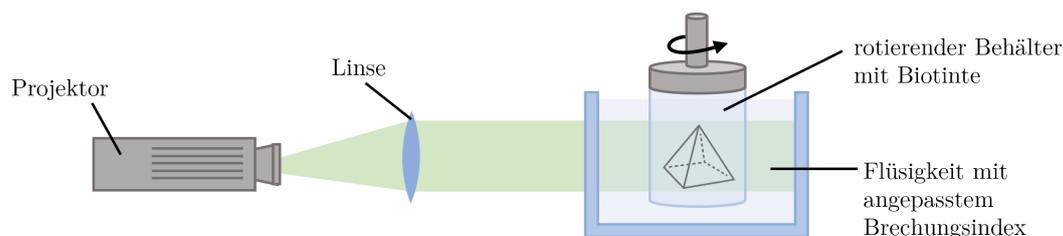
Ein großer Vorteil dieser Methoden ist die hohe Geschwindigkeit der Prozessierung. Da in einem Prozessschritt eine vollständige Schicht in wenigen Sekunden vernetzt werden kann, können komplexe dreidimensionale Konstrukte innerhalb von Minuten hergestellt werden. Gleichzeitig ist die Auflösung dieser Methode nur durch die Präzision und Fokussierung des Lasers begrenzt und liegt im Bereich von wenigen Mikrometern. Die Zellen werden dabei nur geringen äußeren Kräften ausgesetzt, was der Zellviabilität zugutekommt.[55]

Allerdings wird die Materialauswahl durch die Notwendigkeit des Vorhandenseins fotovernetzbarer chemischer Gruppen begrenzt. Zusätzlich müssen größere Mengen an Material

und damit auch Zellen im Reservoir vorgehalten werden, von dem nur ein Bruchteil vernetzt wird. Dies erhöht die Kosten enorm und reduziert die Materialeffizienz.

### 1.5.4 Volumendruck

Das volumetrische Drucken oder auch „Computed Axial Lithography“ (CAL) ist in dieser Form die jüngste der vorgestellten Methoden im Bereich Biodruck.[56] In diesem System befindet sich die fotovernetzbare Biotinte in einem transparenten Zylinder, der präzise rotiert werden kann und von einem digitalen Videoprojektor seitlich belichtet wird (Abb. 1.11). Das abzubildende Objekt kann beispielsweise durch Rekonstruktion aus einem Computer Tomographischen (CT) Scan erzeugt werden. Daraus werden Einzelbilder extrahiert, jedoch nicht in translatorisch horizontalen Schichten, sondern axial mit definiertem Winkelversatz zueinander. Diese Einzelbilder werden nacheinander auf die Biotinte projiziert, wobei die Projektionen exakt mit der Rotation des Zylinders abgestimmt sind. Die Superposition der Belichtungsdosis aus jedem Winkel führt im ersten Schritt zur Bildung freier Radikale, welche vom vorhandenen Sauerstoff deaktiviert werden. Dadurch wird in Volumenelementen mit hoher Belichtungsintensität der Sauerstoff aufgebraucht, bis ein Schwellwert überschritten wird. Unterhalb dieser kritischen Sauerstoffkonzentration im Material können die durch Belichtung entstehenden freien Radikale nicht mehr deaktiviert werden und initiieren die chemische Vernetzung des Polymers. Diese nichtlineare Materialantwort durch die Inhibition von Sauerstoff führt zur simultanen Materialisierung des dreidimensionalen Objekts im gesamten Volumen.



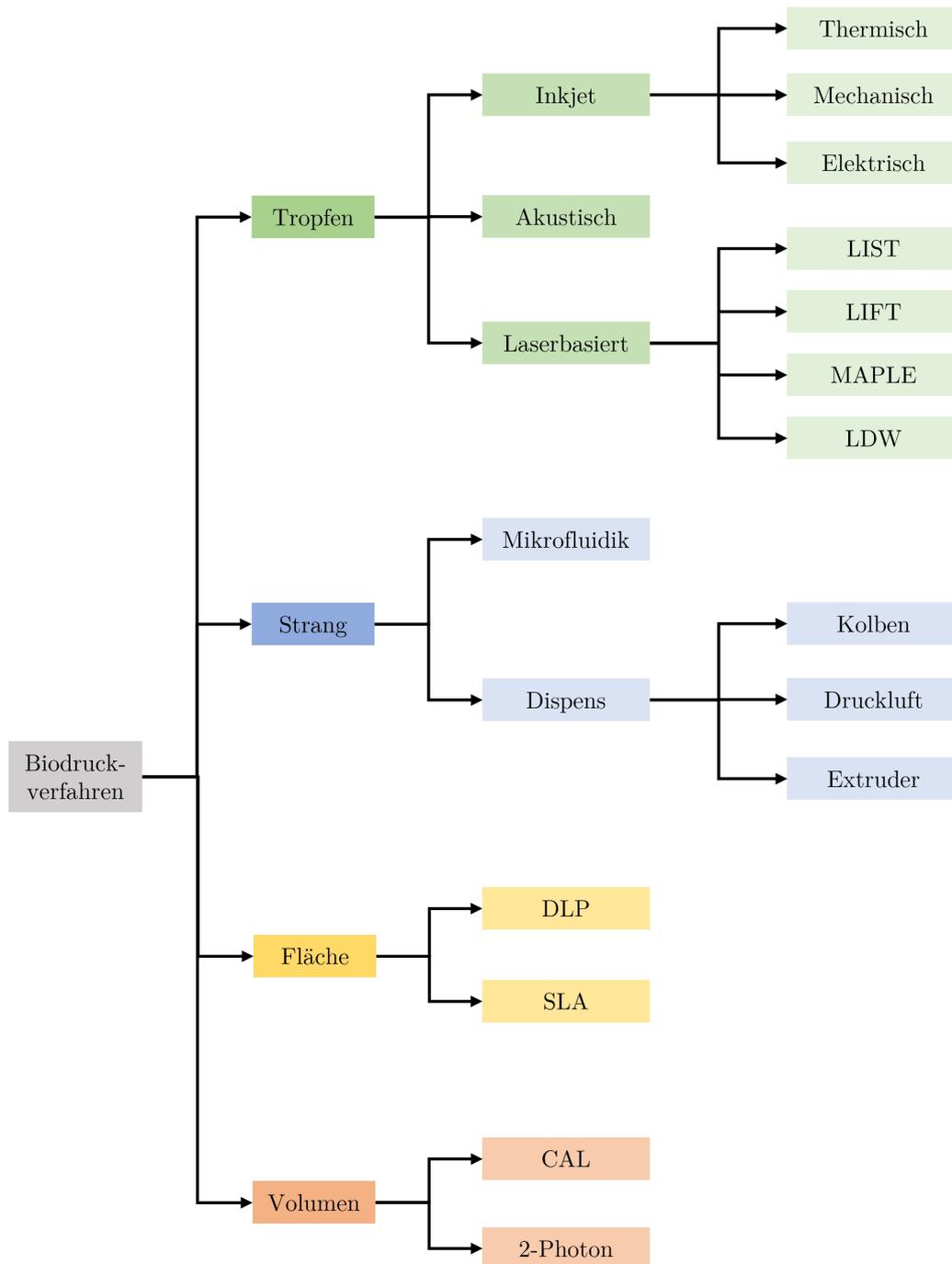
**Abbildung 1.11:** Schematische Darstellung des Volumendruckverfahrens CAL.

Der größte Vorteil dieser Methode liegt in der enormen Geschwindigkeit der Prozessierung. So können zentimetergroße Objekte bereits in weniger als einer Minute hergestellt werden. Gleichzeitig sind hohe Auflösungen für Details im Bereich von 10 Mikrometern möglich. Die kurze Prozessierungsdauer in Verbindung mit der entfallenden Scherbelastung ist darüber hinaus sehr zellschonend.

Das volumetrische Drucken bietet jedoch nur eine begrenzte Auswahl an kompatiblen Materialien, die bezüglich Viskosität und Vernetzbarkeit spezifisch auf das Verfahren ab-

gestimmt sein müssen. Zudem erlauben die aktuellen Geräte nur die Verwendung eines Materials gleichzeitig, was die Materialeffizienz beeinträchtigt und die Kosten erhöht, da der gesamte potenzielle Bauraum mit Biotinte vorgehalten werden muss.

Die nachfolgende Abbildung 1.12 präsentiert eine systematische Übersicht der verschiedenen vorgestellten Druckverfahren, die entsprechend der Dimension ihrer inkrementell erzeugten Einheit klassifiziert sind.



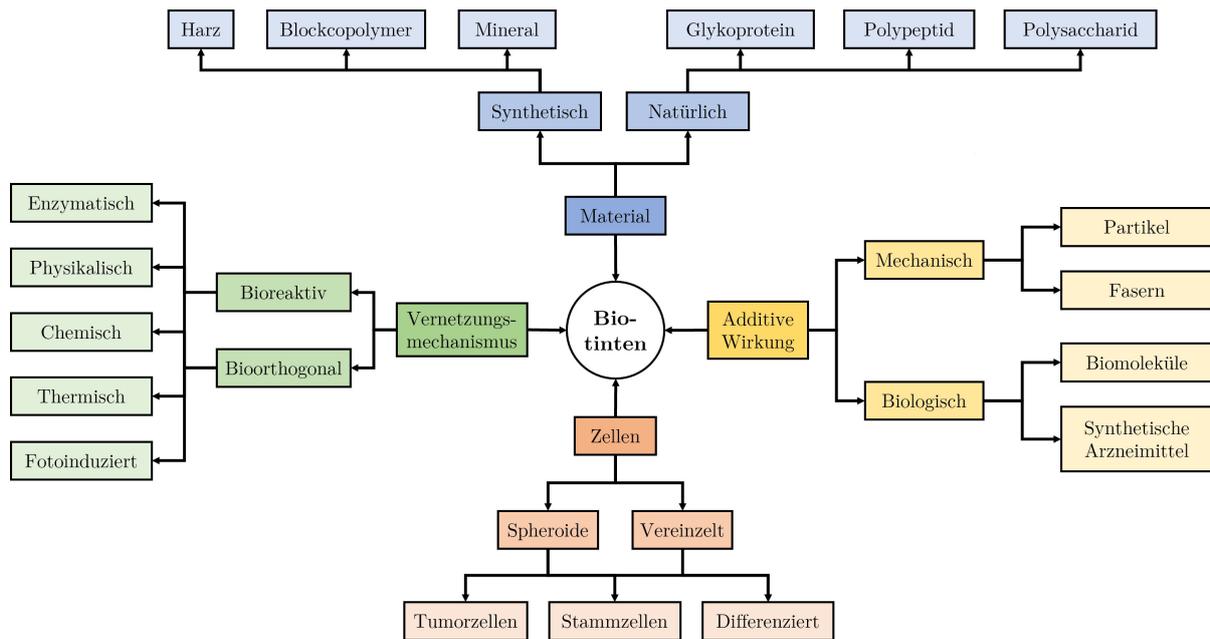
**Abbildung 1.12:** Schematische Übersicht der aktuell eingesetzten Biodruckverfahren nach Tropfen-, Strang-, Flächen- oder Volumendruck.

Da zum derzeitigen Stand der Forschung noch viele verschiedene Materialien als Biotinten in Frage kommen und charakterisiert werden müssen, ist Flexibilität in der Materialwahl ein entscheidender Vorteil für das verwendete Verfahren. Hier hat der Dispersdruck seine Vorteile, da durch die Verwendung mehrerer Druckköpfe in einem Gerät mit geringem Aufwand Konstrukte mit unterschiedlichen Stützmaterialien und Zelltypen hergestellt werden können. Diese Flexibilität in der Anzahl und Kombination der gewünschten Materialien, die einfache Bedienung und vergleichsweise günstigen Geräte, gepaart mit einer Durchsatzrate, die für klinisch relevante Größenskalen ausreichend ist, macht den Dispersdruck aktuell zu der am weitesten verbreiteten Methode in der Biofabrikation.[51]

## 1.6 Biotinten

Allen beschriebenen Verfahren der Prozessierung gemein ist die Verwendung von Biotinten, welche zum Aufbau der Gewebe- und Organstrukturen eingesetzt werden. Diese Biotinten setzen sich laut Definition aus mehreren Komponenten zusammen und bilden „eine prozessierungsgerechte Formulierung von Zellen für eine automatisierte Biofabrikationstechnologie die auch biologisch aktive Komponenten und Biomaterialien enthalten kann“ [57]. Ein zentraler Bestandteil von Biotinten sind demnach *in vitro* kultivierte menschliche Zellen des Patienten. Diese werden aus einer Biopsie gewonnen und nach Kultivierung in einer Lösung oder einem Hydrogel aus biokompatiblen und strukturgebenden Polymeren eingebettet. Dabei müssen unterschiedliche Faktoren wie das Material, der Vernetzungsmechanismus, die Zellart und der Einsatz von Additiven für die Funktionalität der Biotinte berücksichtigt werden (Abb. 1.13). Die Auswertung von Pedroza-Gonzalez et al. aus dem Jahr 2021 zeigt, dass die am häufigsten verwendeten Biotinten in absteigender Reihenfolge Alginat, GelMA, Gelatin, Kollagen, HA, PEGDA, Seidenfibroin, Agarose, HAMA und Fibrin sind.[58]

Im Hinblick auf den Extrusionsdruck ist während des Druckvorgangs eine geringe Viskosität und damit flüssiges Verhalten ideal um hohe Auflösungen zu erreichen. Für die geforderte Formstabilität der Konstrukte nach dem Druck ist jedoch eine hohe Viskosität mit einem schnellen Phasenübergang von flüssig zu fest Voraussetzung. Um diesen Widerspruch aufzulösen, machen sich Biotintentwickler unterschiedliche Mechanismen wie physikalische Interaktionen, thermisch- / oder pH-Wert induzierte Zustandsänderungen sowie chemische und fotoinduzierte Vernetzung zu Nutze.[59] Die häufigsten Vernetzungsstrategien sind aktuell ionische Vernetzung durch  $\text{CaCl}_2$  oder  $\text{CaSO}_4$ , fotoinduzierte Vernetzung unter Verwendung von Irgacure und LAP im UV, oder Eosin Y im sichtbaren Wellenlängenbereich und enzymatische Vernetzung mittels Thrombin, MTGase, Tyrosinase und Genipin.[58]



**Abbildung 1.13:** Schematische Darstellung der wichtigsten Einflussfaktoren bei der Konzeption einer anwendungsspezifischen Biotinte.

So können reversible physikalische Interaktionen wie Ionenbindung, hydrophobe Interaktionen oder Wasserstoffbrückenbindungen ausgenutzt werden, um Hydrogele herzustellen die allein durch das Aufbringen von Scherkräften zu fließen beginnen. Diese scherverdünnenden Gele stabilisieren sich nach dem Wegfall der äußeren Kräfte durch erneute Ausbildung der physikalischen Bindungen. Zu den bekanntesten Vertretern dieser Art gehört das synthetische Blockcopolymer Poloxamer 407 (Markenname Pluronic™F-127), aber auch mehrere Vertreter natürlicher Polymere wie Seidenprotein, Matrigel oder kollagenbasierte Biotinten.[59]

Thermisch induzierte Zustandsänderungen können bei Biotinten entweder über Erhitzen oder Kühlen vor oder nach der Prozessierung erreicht werden.[60] Bei den meisten Biotinten mit diesen Eigenschaften führt eine höhere Temperatur zu einer geringeren Viskosität, weshalb die Kartusche geheizt oder der Kollektor gekühlt wird. Hervorragende Druckeigenschaften weisen hier Hydrogele aus der Familie der Poloxamere wie das amphiphile ABA-Typ Poly(2-oxazoline) auf.[61, 62] Daneben werden aber auch natürliche Polysaccharide als Ausgangsmaterial für chemisch modifizierte thermoresponsive Gele verwendet.[63] Durch Variation des Molekulargewichts und des Grades an Modifizierung können so Hydrogele hergestellt werden, die bei Raumtemperatur flüssig sind und bei Körpertemperatur zu gelieren beginnen. Damit können Zellen unter reduzierten Scherkräften in das Gel gemischt und verdrückt werden, wobei trotzdem eine ausreichende Formstabilität nach dem Druck im Bioreaktor gewährleistet ist.[60, 63]

Für eine chemische oder enzymatische Vernetzung muss das Hydrogel in Kontakt mit dem Vernetzer treten. Dies geschieht entweder durch Drucken in ein Fällbad, Beimischen des Vernetzers während des Drucks oder durch Aufbringen des Vernetzers nach jeder gedruckten Schicht. Für die eigentliche Vernetzungsreaktion stehen eine lange Reihe von Mechanismen aus den Bereichen der Stufenwachstumsreaktionen (z. B. Click-Chemie), Kettenpolymerisation, enzymatischen Reaktionen und fotoinduzierten Reaktionen zur Verfügung.[64, 65] Grundsätzlich können alle Unterkategorien dieser Mechanismen danach unterschieden werden, ob sie bioorthogonal sind oder nicht. Als bioorthogonal werden Reaktionen bezeichnet, die ihre biologische Umgebung in keiner Weise beeinträchtigen. Bei fotoinduzierten Reaktionen bedeutet dies, dass auch darauf geachtet werden sollte, dass mit UV-A oder Wellenlängen des sichtbaren Spektrums gearbeitet wird, um die DNA der Zellen nicht zu schädigen.[65]

Neben den verfahrenstechnischen Anforderungen für die Prozessierung ist allerdings auch die Fähigkeit zur Zellinteraktion entscheidend für die Eignung der Biotinte. Hydrogele aus natürlichen Biopolymeren wie Alginat [66], dezellularisierter Extrazellulärer Matrix (dECM) [67], Fibrin [68], Gelatine [69], Hyaluronsäure [70], Kollagen [71], oder Seide [72] sind mechanisch vergleichsweise schwach, zeigen aber große Vorteile in der Zellinteraktion, da sie strukturelle Ähnlichkeiten zur natürlichen ECM aufweisen.[73] Darüber hinaus besitzen Hydrogele aus Fibrin, Gelatine oder Kollagen bereits die notwendigen Signalmoleküle um Zelladhäsion anzuregen.[74]

Hydrogele aus synthetischen Polymeren wie PEG oder Poloxameren zeichnen sich durch ihre gute Verarbeitbarkeit und Formstabilität nach dem Druck aus. Allerdings fehlen ihnen entscheidende biofunktionelle Gruppen für die Zelladhäsion und den enzymgesteuerten Abbau durch die Zellen.[74] Zusätzlich werden bei diesen Hydrogelen deutlich höhere Polymerkonzentrationen (20-30% w/v Polymer) eingesetzt, was die Zellmobilität nach dem Druck stark einschränkt. Aus diesem Grund liegt ein großer Teil der Forschung im Bereich der Materialwissenschaften auf der Modifizierung dieser beiden Polymergruppen. Auf der einen Seite werden natürliche Polymere mit vernetzbaren Gruppen ausgestattet, um chemische und fotoinduzierte Quervernetzungen zur Stabilisierung zu ermöglichen. Auf der anderen Seite werden die synthetischen Polymere mit biofunktionellen Signalmolekülen und Enzymspaltungsstellen versehen, um besser mit Zellen interagieren zu können.

## 1.7 Additive

Da reine Hydrogele in der Regel sowohl chemisch als auch mechanisch isotrop sind, was Zellen keine Anreize für gerichtete Migration oder Proliferation bietet, wird aktuell eine

Vielzahl unterschiedlicher Komponenten für die Herstellung von Kompositgelen untersucht. Durch den Einsatz von Additiven können sowohl die biologischen wie auch die mechanischen Eigenschaften der Hydrogele modifiziert werden. Dies kann durch biofunktionelle Komponenten wie Nährstoffe (Eiweiße, Kohlenhydrate und Fette), Wachstumsfaktoren (PDGF, VEGF, EPO, ...) oder Zytokine erreicht werden, aber auch durch Nano- und Mikropartikel zur Verbesserung des Fließverhaltens oder der Formstabilität. Für die Verbesserung der Mechanik und Fließeigenschaften stehen aktuell besonders Nanotonerden, Kohlenstoff-Nanoröhrchen, Magnetische Nanopartikel oder Nanofasern aus synthetischen und natürlichen Polymeren wie PCL, Zellulose oder Seide im Fokus der Forschung. Diese Füllstoffe beeinflussen die rheologischen Eigenschaften der umgebenden Matrixmaterialien abhängig von den auftretenden Wechselwirkungen und der eingesetzten Konzentration. Der Einsatz von starren Füllkörpern führt dabei zu einer Steigerung der lokalen Schubspannung in der Matrix. Fasern sind im Vergleich zu Nanopartikeln für diese Anwendungen interessanter, da sie neben der mechanischen Stabilisierung der Gelstruktur auch für die Zellen als attraktive Fläche zur Adhäsion und als Orientierung für die gerichtete Migration und das Wachstum zur Verfügung stehen. Dadurch bringen Fasern eine neue hierarchische Ebene im Strukturdesign ein und erlauben die Konstruktion anisotroper Strukturen. Allerdings sind Gefahren, die aus der Einlagerung von Nanopartikeln in Zellen entstehen (Nanotoxizität) noch nicht final geklärt.[75, 76] Die verstärkenden Eigenschaften von Fasersystemen in Hydrogelen wurden beispielsweise von Tonsonboon et. al. demonstriert.[77] Durch die Verwendung von Nanofasern aus Gelatine konnte die mechanische Belastbarkeit von alginatbasierten Hydrogelen um den Faktor sechs gesteigert werden, wobei besonders orientierte Nanofasern zur Stabilisierung in Belastungsrichtung beitrugen. Entscheidende Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz von Fasern als verstärkendes Element ist dabei die gute Druckbarkeit des Komposits.

Aus den Vorbedingungen des Einsatzes von Additiven in Hydrogelen abgeleitet, werden im Folgenden Rahmenbedingungen für die Morphologie und chemischen Eigenschaften der Fasern definiert, die sich aus den unterschiedlichen Anforderungen der Biologie und der Mechanik ergeben. Im Hinblick auf die mechanische Verstärkung der Matrix ist ein geringer Durchmesser (Nanofasern) der Fasern mit einem möglichst hohen Aspektverhältnis (größer 10) und einem hohen Füllgrad (mehr als 20%) als vorteilhaft anzunehmen, wie die Erfahrung aus der Entwicklung faserverstärkter Kunststoffe zeigt.[78] Um eine gute Druckbarkeit mit minimalem Risiko von Verstopfungen der Kapillare während des Druckprozesses zu gewährleisten gilt als Faustregel die maximale Faserlänge entspricht dem Durchmesser der verwendeten Kapillare für den Druck.[79] Im Rahmen dieser Arbeit wird als Kompromiss aus Auflösung und Druckbarkeit des Materials ein Kapillardurchmesser von 100  $\mu\text{m}$  festgelegt. Ein hoher Füllgrad steigert zusätzlich die Wahrscheinlichkeit für eine Verstopfung.[79, 80] Für die Interaktion zwischen Fasern und menschlichen Zellen

wird wiederum aus vorhergehenden Studien angenommen [81], dass Durchmesser im Bereich der Größenordnung von Zellen selbst, d.h. im Bereich von 0,5-5  $\mu\text{m}$  notwendig sind, um eine effektive Ausrichtung der Zellen an der Längsachse von Fasern zu erreichen.[82] Das Aspektverhältnis sollte möglichst groß sein, damit die Zellen eine gute Ausrichtung entlang der Faser entwickeln können. Außerdem muss der Füllgrad hoch genug sein, um Zellen in die Lage zu versetzen in ihrer Umgebung eine Faser zu finden. Ein zu hoher Füllgrad kann allerdings dazu führen, dass die Matrix zu dicht wird und Zellen an der Migration gehindert werden.[83] Des Weiteren muss das verwendete Material zugelassen sein für die medizinische Anwendung im menschlichen Körper und eine biologisch aktive Oberfläche für die Interaktion mit den Zellen besitzen.

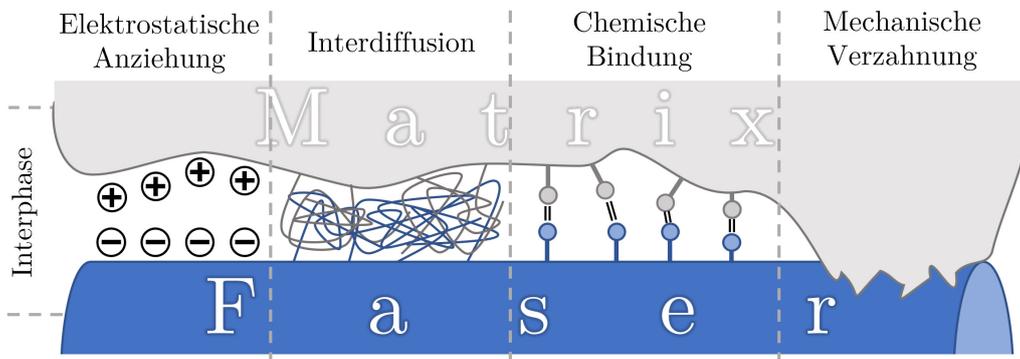
### **1.7.1 Fasermorphologie**

Ein weiterer essenzieller Faktor ist die Morphologie der verwendeten Fasern. Die kritische Länge und der äquivalente Durchmesser und damit das kritische Aspektverhältnis haben einen starken Einfluss auf die Fähigkeit zur Kraftübertragung und auf die Möglichkeit, die Fasern in der Matrix anzuordnen und auszurichten.[84, 85] Der äquivalente Durchmesser wird verwendet, um auch unregelmäßig geformte Fasern und Faserbündel erfassen zu können. Dieser ist definiert als der Durchmesser eines Kreises mit derselben Querschnittsfläche wie der Faserquerschnitt. Die kritische Länge einer Faser wird erreicht, wenn die Kraftübertragung zwischen Faser und Matrix groß genug ist, um die Faser in kleinere Stücke zu brechen.[86] Aus dem Verhältnis der kritischen Länge zum äquivalenten Durchmesser ergibt sich folglich das kritische Aspektverhältnis.[87]

Fasern mit hohem Aspektverhältnis ermöglichen eine effektive Übertragung von Kräften über weite Strecken innerhalb der Matrix und tragen so zu einer Reduzierung von Spannungsspitzen im Material bei. Damit kann eine initiale Rissentstehung verzögert werden. In der weiteren Folge sorgen Fasern, die bereits entstandene Risse überbrücken zu einer Reduzierung der Geschwindigkeit des Risswachstums.[85] Darüber hinaus beeinflusst das Aspektverhältnis die Ausrichtung der Fasern innerhalb einer Matrix. Kurze Faserstücke sind im Extrusionsdruck ohne Anwendung einer zusätzlichen Kraft wie einem äußeren Magnetfeld, kaum effektiv auszurichten.[88] Dies ist ein weiterer Grund Faserfragmente mit höchstem Aspektverhältnis zu präferieren. Die Orientierung durch Aufbringen von Scherkräften ist durch entropieelastische Rotation der Fasern teilweise reversibel, sobald der Druckprozess beendet ist, was die Kontrolle dieses Prozesses erschwert.

## 1.7.2 Faser-Matrix Interaktionsmechanismen

Neben der Morphologie und chemischen Zusammensetzung der Fasern ist deren Interaktion mit der Matrix entscheidend dafür, ob und in welchem Ausmaß Kräfte innerhalb des Faserverbundmaterials übertragen werden können. Die Interaktionen werden, wie in Abbildung 1.14 dargestellt, in die vier Bereiche Interdiffusion, elektrostatische Adhäsion, chemische Bindung und mechanische Verzahnung eingeteilt.[89] Die resultierende Grenzschichtadhäsion ist ein Zusammenspiel dieser Faktoren, wobei in den meisten Fällen ein Effekt dominiert. Im Falle der Einbettung in ein Hydrogel mit geringer mechanischer Stabilität spielt die mechanische Verzahnung zwischen Fasern und Matrix nur eine untergeordnete Rolle. Durch den hohen Wasseranteil in Hydrogelen von über 90% sind starke attraktive Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen sowie chemische Bindungen zwischen Faseroberfläche und strukturellem Polymer die vorherrschenden Interaktionsmechanismen in diesem System.[90] Der hohe Wasseranteil im Hydrogel reduziert auch die Effektivität von eventuell auftretender elektrostatischer Adhäsion drastisch. Sind die Interaktionskräfte zwischen Faser und Matrix nur schwach ausgeprägt, kann dies sogar zu einer Schwächung des Komposits führen, da die Fasern die Netzwerkstruktur der Matrix unterbrechen können und damit Sollbruchstellen an den Phasenübergängen entstehen.[91, 92] Eine Anpassung der Oberflächenchemie über unterschiedliche Beschichtungsverfahren kann jedoch zu einer Stärkung von attraktiven Wechselwirkungen führen und diese Problematik umgehen.[93, 94]



**Abbildung 1.14:** Schematische Darstellung von Faser-Matrix Interaktionsmechanismen. In der Interphase tragen hauptsächlich elektrostatische Anziehung, Interdiffusion, chemische Bindungen und mechanische Verzahnung zur Stabilität der Faser-Matrix Bindung bei.

## 1.8 Natürliche Zell-Faser-Interaktionen

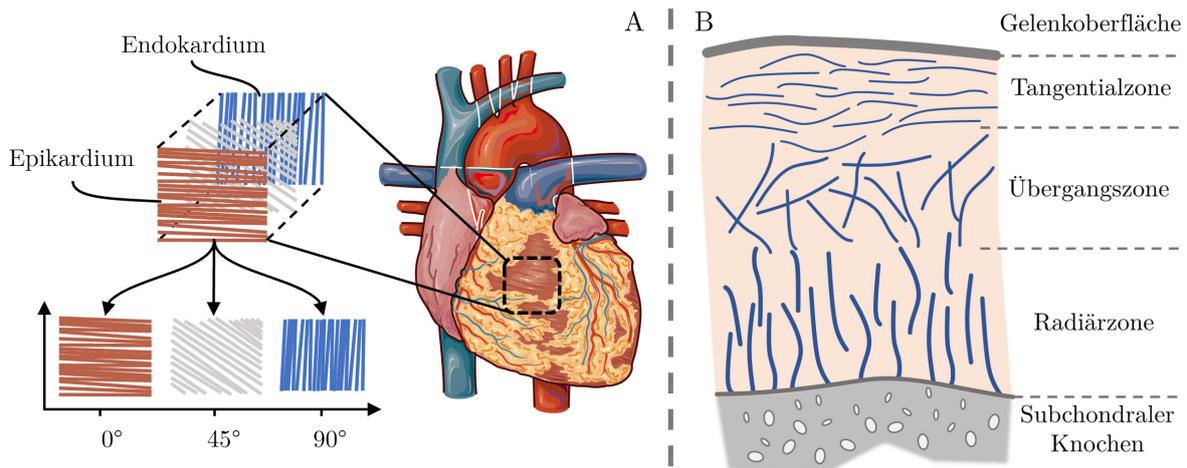
Eine prozesstechnische Betrachtung zeigt, dass Fasern als verstärkende Strukturelemente deutlich aufwändiger zu verarbeiten und zu analysieren sind als beispielsweise Nanopar-

tikel, die einen ähnlichen Einfluss auf die rheologischen Eigenschaften von Hydrogelen ausüben können.[95, 96] Fasern sind in diesem Vergleich aufgrund ihrer Morphologie und Tendenz zur Ausbildung von Verschlaufungen um ein Vielfaches komplizierter. Die erfolgreiche Prozessierung setzt deshalb eine genaue Kontrolle über die Verteilung und Ausrichtung der Fasern voraus, um eine übermäßige Agglomeration und die damit verbundene Gefahr von Verstopfungen der Kanüle während des Druckprozesses zu vermeiden.

Neben der reinen Verbesserung der Mechanik ist die biologische Funktion von Fasern im gedruckten Konstrukt jedoch von großer Bedeutung. Die verschiedenen natürlichen Gewebearten, die als Vorbild für die Biofabrikation dienen, zeichnen sich Großteils durch ihren hierarchischen Aufbau von anisotropen Strukturen aus. Eine Eigenschaft, der in der Entwicklung von künstlichem Gewebe Rechnung getragen werden muss, da viele Funktionen des Gewebes inklusive der Steuerung von Zellverhalten über Gradienten ablaufen. In einer isotropen Umgebung gibt es für Zellen keine Orientierung für gezielte Migration, Proliferation oder Differenzierung. Erst das Vorhandensein eines chemischen, mechanischen oder anderer Gradienten ermöglicht die Ausbildung einer komplexen und funktionellen Struktur.

Dies zeigt auch eine Betrachtung der vorhandenen Proteine der extrazellulären Matrix (EZM) in natürlichem Gewebe, welche zu einem großen Teil in Form von Fasern oder Fibrillen vorliegen. Zu den bekannten faserbildenden Proteinen zählen jene aus der Klasse der Kollagene, sowie Fibronectin, Tenascin, Elastin und Laminin, die jeweils unterschiedliche mechanische und biochemische Aufgaben im Gewebe übernehmen.[97, 98] Die durch diese Proteine aufgebauten, zum Teil sehr komplexen Faserstrukturen, bestimmen zu einem Großteil die Mechanik des makroskopisch betrachteten Gewebes wie in Abbildung 1.15 beispielhaft dargestellt wird.

So bestehen Gelenkknorpel aus drei Schichten an Kollagenfasern, wobei die oberste Schicht aus Kollagen Typ II Fasern besteht, die parallel zur Oberfläche ausgerichtet und dicht gepackt sind.[99] In der mittleren Schicht sind die Fasern zufällig angeordnet, weisen jedoch größere Durchmesser auf. Die Kollagenfasern mit dem größten Durchmesser finden sich in der untersten Schicht und sind senkrecht zur Oberfläche orientiert.[100] Ein weiteres Beispiel für den Einfluss von Faserausrichtung auf die spätere Funktion ist der Aufbau des Herzmuskelgewebes. In der Herzmuskelwand bestimmt die Orientierung der Myofibrillen maßgeblich die Stressverteilung im gesamten Gewebe während der Kontraktion. Kleine Abweichungen in der Faserausrichtung ( $\pm 10^\circ$ ) können in Simulationen bereits zu großen Unterschieden in der Belastung einzelner Myofibrillen führen ( $\pm 50\%$ ). Durch die gesamte Dicke des Gewebes betrachtet, ändert sich die Faserausrichtung dabei um  $90^\circ$  bis  $150^\circ$ . [101–103] Diese Beispiele zeigen, dass Ausrichtung und Durchmesser der Faserbestandteile grundlegende Parameter für funktionales Gewebe darstellen.



**Abbildung 1.15:** Fasern als funktionelle Strukturelemente in natürlichem Gewebe. A: Herz- muskelzellen ändern bei Betrachtung durch die Schichtdicke kontinuierliche ihre Orientierung für gezielte Kontraktion. B: Aufbau eines Gelenkknorpels mit Anordnung der Kollagenfasern in drei Zonen mit unterschiedlichen Durchmessern und Ausrichtungen. Teile der Abbildung wurden unter Verwendung von Bildern von Servier Medical Art erstellt. Servier Medical Art von Servier ist lizenziert unter einer Creative Commons Attribution 3.0 Unported Lizenz (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Da das Ziel der Biofabrikation ist, diese und andere ähnliche Strukturen in einem Bottom-Up-Ansatz nachzubauen und die Zellen beim Druck in einem dreidimensionalen Gerüst anzuordnen, ist der Einsatz von faserbildenden Systemen ein zentrales Mittel, um die nachfolgenden Reifeschritte im Bioreaktor zu verkürzen. In diesem Zug übernehmen die Fasern im Hydrogel neben den Vorgaben der Mechanik weitere Aufgaben in der Einleitung von Zelldifferenzierung, der Steuerung von Zellmigration und der Proliferation. Chrobak et al. konnten zeigen, dass sich Zellen auch ohne direkten Kontakt allein durch den mechanischen Gradienten auf Fasern zu bewegen oder sich an deren Ausrichtung orientieren können.[104] Dabei kann der Einfluss von Fasern auch noch in bis zu 100  $\mu\text{m}$  Entfernung von einigen Zellen wahrgenommen werden, was den Spielraum in der angewandten Faserkonzentration erweitert, da nicht überall ein direkter Kontakt gegeben sein muss.

Die Interaktion zwischen den Zellen und fibrillären bzw. faserartigen Strukturen in ihrer Umgebung findet dabei hauptsächlich über die transmembranen Adhäsionsrezeptoren, den Integrinen, statt. Sie sind primär verantwortlich für Erkennung und Ausbildung von Zell-Matrix-Bindungen, können aber auch in Bindungen zwischen Zellen involviert sein.[105] Integrine bilden eine Verbindung der extrazellulären Umgebung der Zelle mit den zytosplasmatischen Signalwegen im Zellinneren. Dadurch ermöglichen sie die Verankerung von Zellen an äußeren Strukturelementen und legen die Grundlage für die Ausbildung von Gewebe. Die Signalübertragung funktioniert dabei bi-direktional durch die Plasmamembran und kann durch biochemische Signale oder mechanische Kräfte ausgelöst werden.

So kann zum einen durch Bindung an extrazelluläre Liganden eine Signalübertragung an das Zellinnere ausgelöst werden. Zum anderen können auch intrazelluläre Vorgänge zu einer Änderung der Empfindlichkeit der Bindungsdomänen des Integrin-Heterodimers führen.[106] Dabei bestimmt das spezifische Repertoire an Bindungspartnern zusammen mit mechanischen Signalen die Interaktion der Integrine mit dem Aktin-Zytoskelett der Zelle.

Im Anschluss an eine Integrinaktivierung interagieren zunehmend mehr Integrine mit den extrazellulären Matrixproteinen und bilden wachsende Cluster. Die Adhäsion reift im Folgenden durch den Aufbau eines Netzwerks an zytoplasmatischen und zytoskelettalen Proteinen zu fokalen Adhäsionen, die zu einer engen Kopplung an das Zytoskelett der Zelle führen.[107] Während diese Adhäsionspunkte zu Beginn lediglich eine Fläche von rund  $0,25 \mu\text{m}^2$  beanspruchen, können komplett ausgebildete fokale Adhäsionen auf bis zu  $1-1,5 \mu\text{m}$  in der Breite und  $4-6 \mu\text{m}$  in der Länge anwachsen.[108] So bildet sich eine stabile Verbindung zwischen der Zelle und der Adhäsionsoberfläche aus, über die biochemische Signale und mechanische Kräfte übertragen werden. Die Gesamtheit, der an der Integrin vermittelten Adhäsion beteiligten Proteine, wird dabei als „Integrin Adhesom“ bezeichnet. Die Adhäsion an komplexeren Strukturen wie Faseroberflächen wird jedoch von spezifischen Fasereigenschaften der Morphologie, Ausrichtung und Oberflächenchemie stark beeinflusst.

## **1.9 Zielsetzung**

Nach dem derzeitigen Stand der Forschung im Bereich der Biotinten für die Biofabrikation ist die Erweiterung des Biofabrikationsfensters ein wesentlicher Baustein auf dem Weg zur Herstellung funktioneller Gewebekonstrukte. Dieser Begriff beschreibt das Spannungsfeld, dass einerseits eine ausreichende mechanische Stabilität der gedruckten Konstrukte gefordert wird, andererseits Zellen in der Lage sein sollen, durch das Material zu wandern und kontrolliert zu proliferieren. Um die gewünschten mechanischen Eigenschaften zu gewährleisten, muss in der Regel die Polymerkonzentration erhöht werden, durch die damit verbundene Verdichtung des Materials werden die Zellen jedoch eingekapselt und an der Migration gehindert. Ein vielversprechender Ansatz zur Lösung dieses Dilemmas ist die Verwendung von faser- oder partikelbasierten Füllstoffen, um die mechanische Stabilität bei reduzierter Polymerkonzentration zu gewährleisten. Darüber hinaus bietet die Integration einer zusätzlichen Hierarchieebene die Möglichkeit, Zellen in einer anisotropen Umgebung zur gerichteten Migration anzuregen.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Faserverstärkungssystems als Plattformtechnologie zur Verbesserung der Druckeigenschaften und der biologischen Eigenschaften von Hydrogelen in der Biofabrikation. Zur systematischen Erfassung und Validierung der rheologischen Eigenschaften soll zudem eine Analysemethode entwickelt werden, um scherrheologische Messungen mit den tatsächlichen Druckeigenschaften während und nach dem Druck aus der Praxis vergleichen zu können. Die Entwicklung eines mathematischen Modells zur Beschreibung des Verhaltens soll darüber hinaus die Vorhersage und Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Materialkombinationen ermöglichen. Dazu werden im ersten Schritt Verfahren zur Herstellung von Faserfragmenten mit kontrollierbarer Morphologie entwickelt. Diese Fragmente werden im zweiten Schritt mit verschiedenen Hydrogelen gemischt, um das Fließverhalten im 3D-Druck und die Rheologie der Komposit-Hydrogele systematisch zu analysieren. Im dritten Abschnitt wird die Interaktion verschiedener Zelltypen mit unbeschichteten und beschichteten Fasern und Fragmenten hinsichtlich Zellüberleben, Zellmigration und Zellproliferation untersucht. Abbildung 1.16 gibt einen Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit behandelten Arbeitspakete.

### **1.9.1 Herstellung von Faserfragmenten**

Bei der Entwicklung der Fasern sind folgende Rahmenbedingungen zu berücksichtigen: Es dürfen nur Materialien verwendet werden, die bereits für die medizinische Anwendung im menschlichen Körper zugelassen sind. Der Durchmesser der Fasern soll in der Größenordnung der Zellen liegen, um eine stabile mechanische Interaktion zu ermöglichen. Die Fasern

müssen als Fragmente vorliegen, um einen kontinuierlichen Druckprozess zu ermöglichen. Das Aspektverhältnis der Fasern sollte so hoch wie möglich sein, um Ausrichtungseffekte zu begünstigen, aber die Faserlänge sollte kleiner als der Durchmesser der Kanüle sein, um Verstopfungen während des Druckens zu minimieren. Für die Herstellung der Faserfragmente soll daher Polycaprolacton (PCL) als Ausgangsmaterial verwendet werden, da es flexibel zu verarbeiten ist, gute mechanische Eigenschaften aufweist, biokompatibel und biologisch abbaubar ist sowie eine Zulassung für den medizinischen Einsatz im menschlichen Körper hat. PCL unterschiedlicher Molekulargewichte soll durch elektrostatisches Faserspinnen aus Lösung und im Schmelz-Elektro-Schreibverfahren (Melt-Electro-Writing, kurz: MEW) zu Fasern verarbeitet werden. Dabei sollen geeignete Prozessfenster für die Verarbeitung verwendet und ein Verfahren zur kontinuierlichen Fragmentierung der entstehenden Fasern entwickelt werden. In diesem Zusammenhang soll auch der Einfluss maßgeblicher Prozessparameter auf die Morphologie der Fragmente untersucht werden, mit dem Ziel, kontrollierbare Geometrien zu erzeugen.

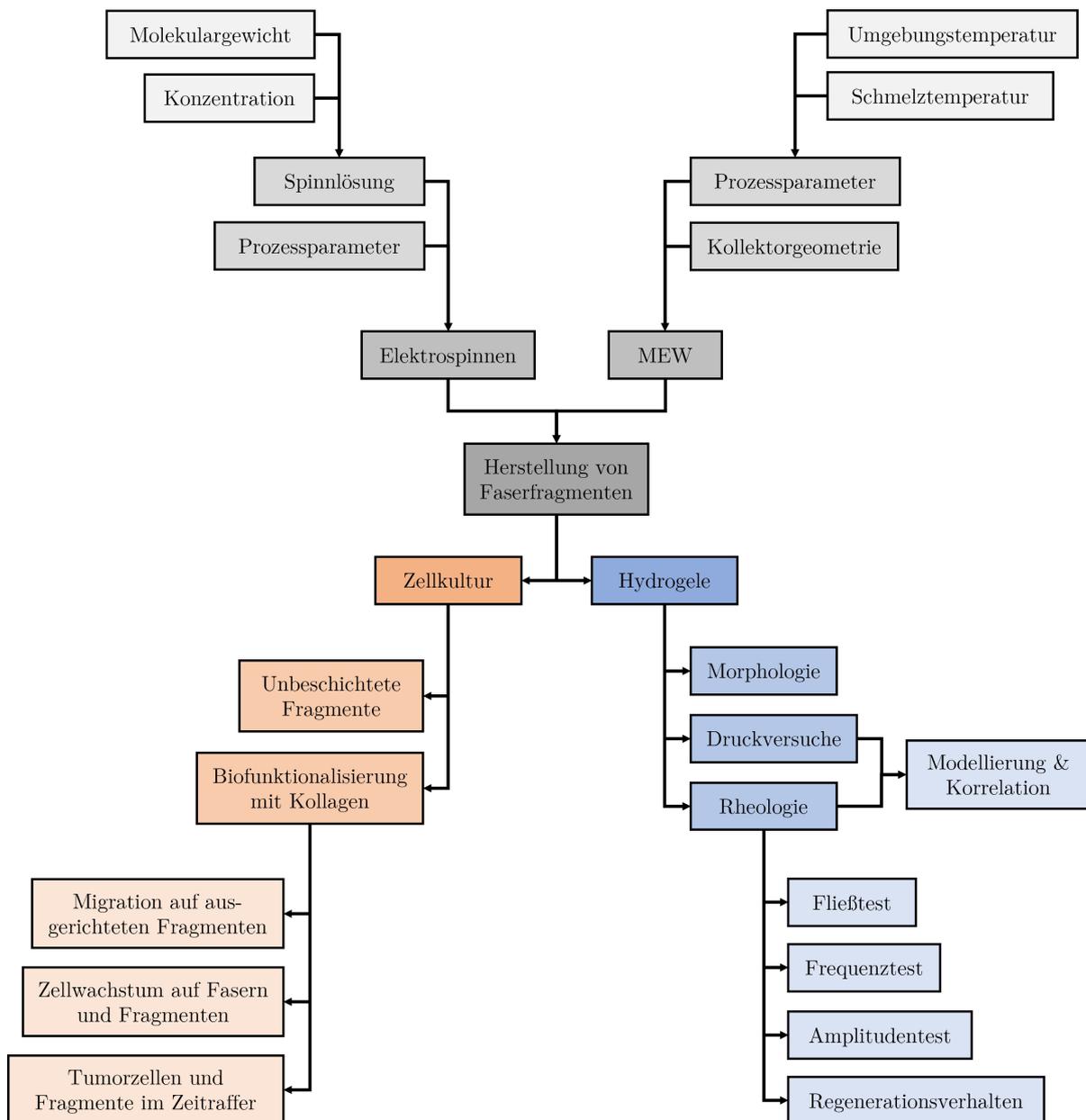
### **1.9.2 Interaktion zwischen Fasern und Hydrogelen**

Die hergestellten Faserfragmente sollen mit Hydrogelen aus Alginat, Pluronic und rekombinantem Spinnenseidenprotein (eADF4(C16)) in unterschiedlichen Konzentrationen gemischt werden, um Kompositgele herzustellen. Als Referenzsystem werden Cellulose-Nanofasern verwendet. Um die Veränderung der Porenstruktur zu untersuchen, sollen diese Komposite mittels Rasterelektronenmikroskopie morphologisch untersucht werden. Darüber hinaus soll ein zeit- und materialsparendes Messprotokoll zur rheologischen Untersuchung der Kompositgele entwickelt und zur Bewertung eingesetzt werden. Parallel dazu soll ein neuer Messaufbau entwickelt werden, um das Verhalten der Kompositgele während und nach dem Druck genauer dokumentieren zu können. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der Untersuchung der zeitabhängigen Änderung der Strangbreite des Hydrogels. Die Ergebnisse dieser praxisnahen Druckversuche sollen anschließend genutzt werden, um Korrelationen mit rheologischen Modellen zu ermöglichen. Ziel ist die Entwicklung eines neuen Modells zur Überprüfung der systematischen Einflussgrößen der Fasern auf die Druckeigenschaften der Hydrogele und damit die Beschleunigung der Entwicklung neuer Biotinten.

### **1.9.3 Interaktion zwischen Fasern und Zellen**

Zur Untersuchung der Zell-Faser-Interaktion sollen zunächst einzelne Zellen auf einzelnen Fasern kultiviert werden, um einen Effekt auf die Zellmorphologie zu ermitteln. An-

schließlich sollen verschiedene biofunktionale Beschichtungen (Plasma, Fibronektin und Kollagen) miteinander verglichen werden. Die Beschichtung mit der höchsten Zellviabilität wird anschließend verwendet, um das Migrations- und Proliferationsverhalten von U87-Reporterzellen auf Fasern und Fragmenten mit unterschiedlichem Orientierungsgrad zu untersuchen. Zusätzliche Experimente mit FUCCI Tumorzellen mittels Fluoreszenzzeitrafferaufnahmen sollen eine zeitaufgelöste Analyse des Zellverhaltens und der Selbstassemblierung mit Faserfragmenten ermöglichen.



**Abbildung 1.16:** Schematische Übersicht der zentralen Arbeitspakete, Experimente und untersuchten Prozessparameter in dieser Arbeit.

# Kapitel 2

## Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Verbrauchsmittel

<b>Verbrauchsmittel</b>	<b>Hersteller</b>
Aluminiumklebeband	3M, St.Paul, USA
Bechergläser	VWR International, PA, USA
CellCrowns (12-Well)	Scaffdex, Tampere, FIN
Curwood Parafilm M	Bemis, Neenah, USA
Dialyseschlauch (6-8 kDa)	Spectrum Labs, New Brunswick, USA
Diamantmesser Ultra 358	Diatome, SUI
Einwegspritzen (3, 5, 10 ml)	B.Braun, Melsungen, DE
Exsikkator	VWR International, PA, USA
Filter PA 6.6 150 $\mu\text{m}$ No. 948381	Reichert Chemietechnik GmbH, DE
Filter PA 6.6 50 $\mu\text{m}$ No. 948421	Reichert Chemietechnik GmbH, DE
Filter PA 6.6 antistatisch 82 $\mu\text{m}$ No. 948602	Reichert Chemietechnik GmbH, DE
Filter PE 80 $\mu\text{m}$ No. 95820	Reichert Chemietechnik GmbH, DE
Glasobjektträger	Carl Roth GmbH + Co. KG, DE
Kanülen (18 G, 21 G, 25 G, 27 G)	B.Braun, Melsungen, DE
Kanülen 21 G, Cat. No.371.0820	Scorex Isba SA, SUI
Karbon-Klebe pads 12 mm	Agar Scientific, UK
Kartuschen 5 ml	Cellink AB, Sweden
Kupfer Tape	Plano GmbH, DE

<b>Verbrauchsmittel</b>	<b>Hersteller</b>
Laborflaschen	Duran Group, DE
Labortücher Kimtech Science	Kimberley-Clark, TX, USA
Messzylinder	VWR International, PA, USA
Mikroreaktionsgefäße 0,5/1,0/2,0 ml	Eppendorf, DE
Parafilm	Bemis, WI, USA
Petrischalen	Sarstedt, DE
Pipette für hochviskose Medien	Mettler-Toledo GmbH, DE
Pipetten 1000/200/10 µl	Eppendorf, DE
REM Probenträger	Agar Scientific, UK
Rührfische	VWR International, PA, USA
Schlauch Perfusor Line 30 cm	B.Braun, Melsungen, DE
Sedimentiergefäß ROTILABO® nach Imhoff	Carl Roth GmbH + Co. KG, DE
Siliziumwafer	MicroChemicals GmbH, DE
Skalpelle	B.Braun Melsungen, DE
Spritzen Omnifix Luer Lock Solo	B.Braun, Melsungen, DE
Wägeschälchen	Carl Roth GmbH + Co. KG, DE
Well-Platten 12/24/48	Thermo Scientific, Waltham, USA

## 2.1.2 Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
1,2-Propanediol	abcr GmbH, DE
1,6-Diaminohexan	Th. Geyer GmbH & Co KG, DE
Acetic Acid 99-100%	VWR Chemicals, DE
ActinGreen	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Alginat PH176	JRS PHARMA GmbH & Co. KG, DE
Alpha-actinin antibody (EA-53, ab-9465)	Abcam, UK
AZ 326 MIF	MicroChemicals GmbH, DE
AZ 40 XT	MicroChemicals GmbH, DE
AZ 400K Developer MIC - 5L	MicroChemicals GmbH, DE
AZ 4562	MicroChemicals GmbH, DE
BALB/3T3-Fibroblasten (murin)	ATCC, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, DE

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Calcein AM	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Calcium chloride	Carl Roth GmbH + Co. KG, DE
Collagen Typ	ibidi GmbH, DE
DAPI	Thermo Fisher Scientific, DE
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	VWR, Darmstadt, DE
eADF4(C16)	AMSilk, DE
Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)	VWR, Darmstadt, DE
ethidium homodimer	Sigma-Aldrich, MO, USA
Fetales Kälberserum (FBS)	VWR, Darmstadt, DE
Fibronectin	Sigma-Aldrich, MO, USA
Formaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG, DE
Formic Acid 99-100%	VWR Chemicals, DE
Gentamycin	Sigma-Aldrich, MO, USA
GlutaMAX	Life Technologies, MA, USA
Glutamin	Thermo Fisher Scientific, DE
Glutaraldehyd 25%	Carl Roth GmbH + Co. KG, DE
Hexafluoroisopropanol (HFIP)	abcr GmbH, DE
L-DOPA	Sigma-Aldrich, MO, USA
Lithium Bromide	Thermo Fisher Scientific, DE
MEM	Gibco, MA, USA
Mowiol	Sigma-Aldrich, MO, USA
Natriumpyruvat	Life Technologies, MA, USA
normal goat serum (NGS)	Thermo Fisher Scientific, DE
PBS	Carl Roth GmbH + Co. KG, DE
Penicillin/Streptomycin (pen/strep)	Thermo Fisher Scientific, Bonn, DE
Penizillin	Life Technologies, MA, USA
Phalloidin Dylight 488	Thermo Fisher Scientific, DE
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	VWR, Darmstadt, DE
Poloxamer 407 (Pluronic <sup>TM</sup> F127-P2443)	Merck KGaA, DE
poly ethylene oxide 600kDa	Sigma-Aldrich, MO, USA
Polycaprolacton 14/45/80 kDa	Sigma-Aldrich, MO, USA
Polycaprolacton - Purasorb PC 12	Corbion, NL
Streptomycin	ATCC, USA
Triton-X100	Sigma-Aldrich, MO, USA
Trypsin	Thermo Fisher Scientific, Bonn, DE
Ziegen-Anti-Maus IgG-Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, Bonn, DE

### 2.1.3 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
3D-Biodrucker	Inkredible <sup>TM</sup>	Cellink AB, SWE
CO <sub>2</sub> Inkubator	Heraeus	Thermo Fisher Scientific, DE
EDX	UltraDry EDS-detector	Thermo Scientific, MA, USA
Elektrospinnanlage	Eigenbau	Universität Bayreuth, DE
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMi8	Leica, DE
FTIR	InfraRed Tensor 37	Bruker Corporation, MA, USA
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2 LD+	Christ, Osterode, DE
Heizplatte	RCT Basic	IKA, DE
Kollektorzylinder	Eigenbau	Universität Bayreuth, DE
Konfokalmikroskop	DMi8 SP8 HyVolution	Leica, Wetzlar, DE
Kontakwinkelmessung	Surftens Universal	OEG GmbH, DE
Lichtmikroskop	Eclipse Ts2	Nikon GmbH, DE
Lyophile	ALPHA 1-2 LD Plus	Christ GmbH, DE
Magnetrührer	IKA A25004601	VWR International GmbH, DE
MEW	Eigenbau	Universität Würzburg, DE
Plasmaofen	PlasmaFlecto 10	plasma technology GmbH, DE
Präzisionsheizplatte	HP 60	Torrey Pines Scientific Inc., USA
Projektor Photolithografie	SmartPrint	Smart Force Technologies, FR
Rasterelektronenmikroskop	Apreo Volumescape	FEI/Thermo Scientific, MA, USA
Rotationsverdampfer	Hei-VAP Core	Heidolph Instruments GmbH, DE
Scherrheometer	Discovery HR-2	TA Instruments, Eschborn, DE
Spincoater	SCC-200	IBR Spincoaterworld, DE
Spritzenpumpe	KDS 200	KD Scientific Inc.
Sputtergerät	EM ACE600	Leica Microsystems
Stereomikroskop	M205C	Leica, Wetzlar, DE
Ultraschallgerät	UP200Ht, flat probe	Hielscher Ultrasonics GmbH, DE
Vakuumpumpe	Hei-VAC Vario Station	Heidolph Instruments GmbH, DE
XPS	VersaProbe III	Physical Electronics GmbH, DE
Zeitraffer Zellkultur	zenCELL owl	InnoME GmbH, DE

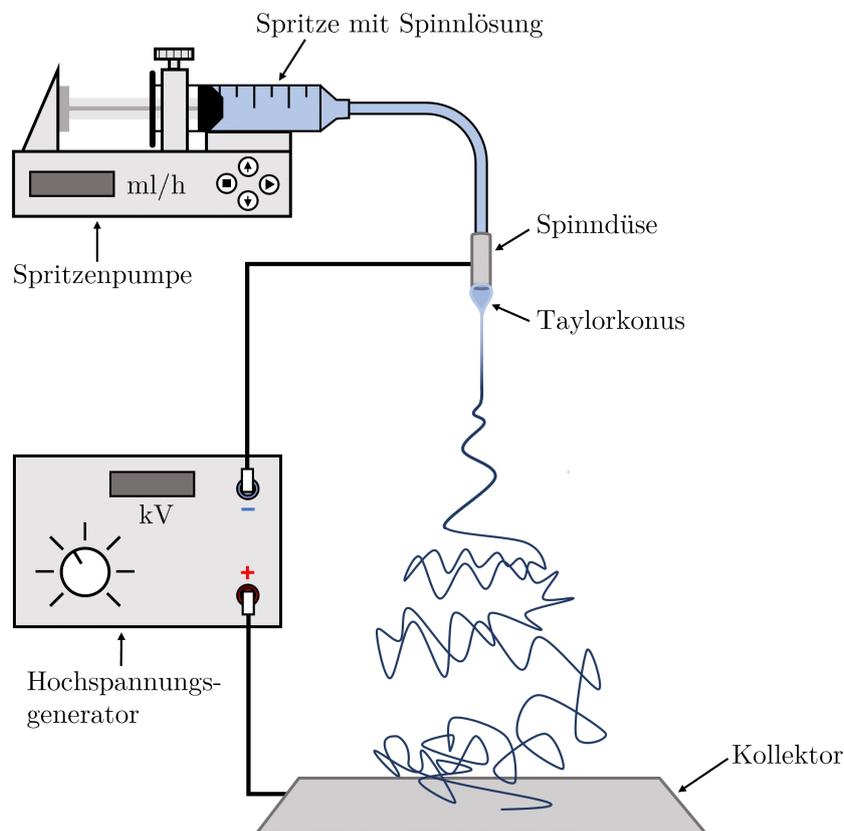
**2.1.4 Software**

Software	Hersteller	Version
Adobe Creative Suite 2	12.0.0	Adobe Systems Software Ireland Ltd, IRL
Creo Parametric	8.0	Parametric Technology GmbH, DE
FEI Apreo	12.1.0	FEI-Thermo Fisher Scientific, USA
ImageJ	1.53q	National Institute of Health, USA
Kinovea	0.9.5	Open Source Software
Leica Application Suite V4.3	4.3	Leica, Wetzlar, DE
Microsoft Office 365	16.0	Microsoft, USA
OPUS	8.0	Bruker Optik GmbH, USA
Origin	2019b	OriginLab, Northampton, USA
Paint.net	4.3.12	Open Source Software
pdf24 creator	8.2.2	geek Software GmbH, DE
TRIOS	5.1.1	TA Instruments, New Castle, USA
Ultimaker Cura	4.9.1	Ultimaker, Utrecht, NL
zenCell owl	3.4.1	innoME GmbH, DE

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Elektrostatisches Faserspinnen aus Lösung

Das elektrostatische Faserspinnen aus Lösung beruht auf einem elektrohydrodynamischen Prozess. Dabei wird ein flüssiger Tropfen elektrisch aufgeladen, um einen Strahl zu erzeugen. Dieser wird in der Folge gedehnt und verjüngt sich bis er durch Verdampfen des Lösungsmittels als Faser mit Durchmessern im Mikrometer- bis Nanobereich auf dem Kollektor abgelegt wird.[109] Der grundsätzliche Aufbau ist vergleichsweise einfach und findet daher bereits in vielen Laboren Anwendung. Hauptbestandteile sind eine elektrische Hochspannungsquelle, eine Spritzenpumpe, eine Spinndüse und ein elektrisch leitfähiger Kollektor, in einer Anordnung wie in Abbildung 2.1 dargestellt.



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung des Aufbaus zum elektrostatischen Faserspinnen aus Lösung. Die Spinnlösung wird über eine Spritzenpumpe aus der Spinndüse extrudiert und bildet im elektrischen Feld, erzeugt durch den Hochspannungsgenerator, einen Taylorkonus. Daraus entspringt ein Polymerstrahl, der auf seinem Weg zum Kollektor Biegeinstabilitäten aufbaut und trocknet.

Während des Spinnprozesses wird ein Polymer in Spinnlösung von der Spritzenpumpe aus der Spinndüse extrudiert. Aufgrund der Oberflächenspannung formt die aus-

tretende Spinnlösung einen Tropfen an der Spitze der Kanüle.[110] Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes zwischen Kanüle und Kollektor wird die Oberfläche der Spinnlösung elektrisch aufgeladen. Bei steigender Feldstärke führen die Abstoßungskräfte gleichnamiger Oberflächenladungen zur Deformation des Tropfens und zur Entstehung eines Taylorkonus.[111] Bei Überschreiten der Oberflächenspannung des Tropfens entsteht an der Spitze des Taylorkonus ein elektrisch geladener Polymerlösungsstrahl, der in Richtung des Kollektors beschleunigt wird. Im ersten Bereich nach dem Taylorkonus bildet der Polymerstrahl eine gerade Linie bis kleinste Deformationen oder Luftbewegungen zu einer Krümmung führen.[112] Dieser Krümmung wirken die Oberflächenladungen durch Abstoßungskräfte entgegen, was weitere Abstoßungskräfte erzeugt. Diese Bewegungen des Strahls schaukeln sich zu sogenannten Biegeinstabilitäten unterschiedlicher Ordnung auf und führen zur Ausbildung komplexer Flugbahnen die der Strahl auf seinem Weg von der Spinndüse zum Kollektor zurücklegt.[113] In diesen Bereichen wird die Faser stark gedehnt und erreicht ihren finalen Durchmesser während das Lösungsmittel vollständig verdampft. Die getrocknete Faser wird in zufälliger Anordnung als Vlies auf dem Kollektor abgelegt.[114] Durch den Einsatz unterschiedlicher Kollektorgeometrien, wie einem rotierenden Zylinder, können die erzeugten Fasern zusätzlich ausgerichtet werden.

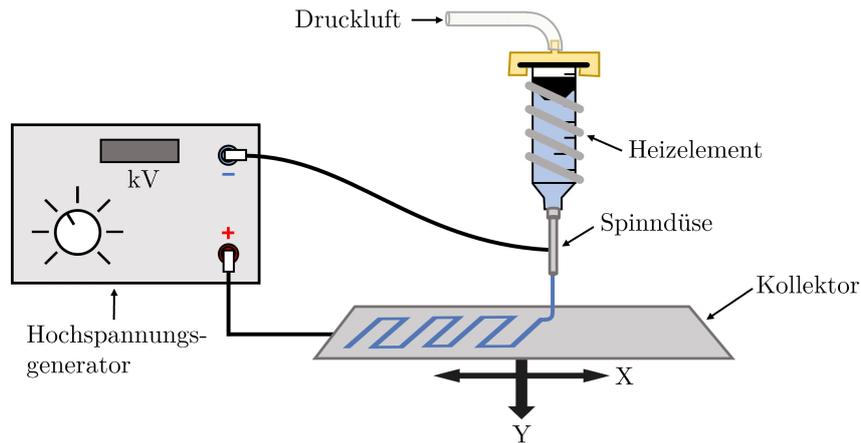
Für die Herstellung der Spinnlösungen in unterschiedlichen Konzentrationen von 10 % w/v bis 30 % w/v wurde die entsprechende Masse an Polycaprolacton eingewogen und über Nacht bei Raumtemperatur in 99% reinem Hexafluorisopropanol (HFIP) gelöst. Die Mischungen aus unterschiedlichen Molekulargewichten von 10/45/80 kDa Polycaprolacton wurden nach dem selben Schema hergestellt. Die Spinnlösungen wurden in 3 ml Luer-Lock Spritzen überführt und in die Spritzenpumpe eingespannt. Die Spritzen wurden über 30 cm Luer-Lock Verbindungsschläuche mit 21 G Kanülen aus Edelstahl im Inneren der Spinnkammer verbunden und fixiert. Für die ersten Untersuchungen der Morphologie der erzeugten Vliese wurde eine plane statische Kollektorplatte im Abstand von 9 cm zur Kanüle verwendet. In der weiteren Folge wurde diese plane Kollektorplatte mit einem Filternetz aus Polyester bestückt, um die Fragmentierung bei kürzeren Spinnzeiten und oberflächenstrukturierter Kollektorgeometrie zu untersuchen. Für den Spinnvorgang wurde ein Hochspannungsgenerator über eine Krokodilklemme jeweils mit der Kanüle (+4 bis +6 kV) und dem Kollektor (-1 kV) verbunden und der Volumenstrom der Spritzenpumpe auf 1 ml/h gesetzt. Die Spinnzeit wurde zwischen 20 min für Proben zur REM-Analyse und 60 min für Proben der Zellkulturversuche variiert.

## **2.2.2 Scale-up des Elektrospleinverfahrens und Extraktion der Fragmente aus dem Elektrospleinprozess**

Nach Festlegung der Spleinparameter und der Zusammensetzung der Spleinlösung für die Produktion größerer Mengen wurde der Vorgang der Faserproduktion aus 2.2.1 und der Extraktion hochskaliert. Dazu wurden mehrere Anpassungen am ursprünglichen Aufbau vorgenommen. Zum einen wurde die Anzahl der Kanülen auf 4 erweitert, zusätzlich wurde als Kollektor ein rotierender Zylinder (Durchmesser 85 mm) mit antistatischem Filtergewebe auf der Oberfläche verwendet. Dadurch konnte eine gleichmäßige Ablage der Fragmente auf einer größeren Fläche erreicht werden. Durch Variation der Umdrehungszahl des Kollektors von 100 RPM auf 10 000 RPM konnten sowohl unausgerichtete Vliese wie auch stark ausgerichtete Fasermatten erzeugt werden. Für die Produktion einer Charge vereinzelter Fragmente in größerem Maßstab wurde für 30 min kontinuierlich gesplein. Das gespleinene Vlies wurde in einem Ethanolbad von dem Filtergewebe des Trägermaterials gelöst und in einem auf 10°C gekühlten Ethanolbad für 2 Stunden mit Ultraschall (70 % Amplitude, Pulsdauer 2:1 (An:Aus) und automatisch angepasster Leistung) behandelt. Die resultierende milchige Suspension enthielt keine identifizierbaren Aggregate mehr. Die Suspension wurde in zwei Schritten grob- und feinfiltriert (150 µm und 50 µm). Die gefilterte Suspension wurde in Sedimentiertrichtern gesammelt und nach 24h wurde das überschüssige Ethanol durch pipettieren entfernt. Durch Bestimmung des Nass- und Trockengewichts einer Probe (1 ml) wurde der Feststoffanteil der Suspension bestimmt und diese für die weitere Verwendung luftdicht verschlossen gelagert.

## **2.2.3 Schmelz-Elektro-Schreib-Verfahren**

Als alternatives Herstellungsverfahren für die PCL-Faserfragmente wurde das Schmelz-Elektro-Schreibverfahren (engl. Melt Electrowriting, kurz MEW) untersucht (Abb. 2.2). Bei diesem Verfahren wird das zu verspleinende Polymer in einer beheizbaren Kartusche im inneren des Druckkopfs zum Schmelzen gebracht. Über das Anlegen von Druckluft an die Kartusche wird die Schmelze nach Bedarf durch eine Kanüle auf den Kollektor extrudiert. Zwischen Kanüle und Kollektor wird dabei ein elektrisches Hochspannungsfeld angelegt.[115]



**Abbildung 2.2:** Schematische Darstellung des Aufbaus zum Schmelz-Elektro-Schreib-Verfahren. Das Polymer wird durch das Heizelement in der Kartusche geschmolzen und mittels Druckluft aus der Spindüse extrudiert. Das elektrische Feld des Hochspannungsgenerator dehnt den Polymerstrahl bis zum beweglichen Kollektor.

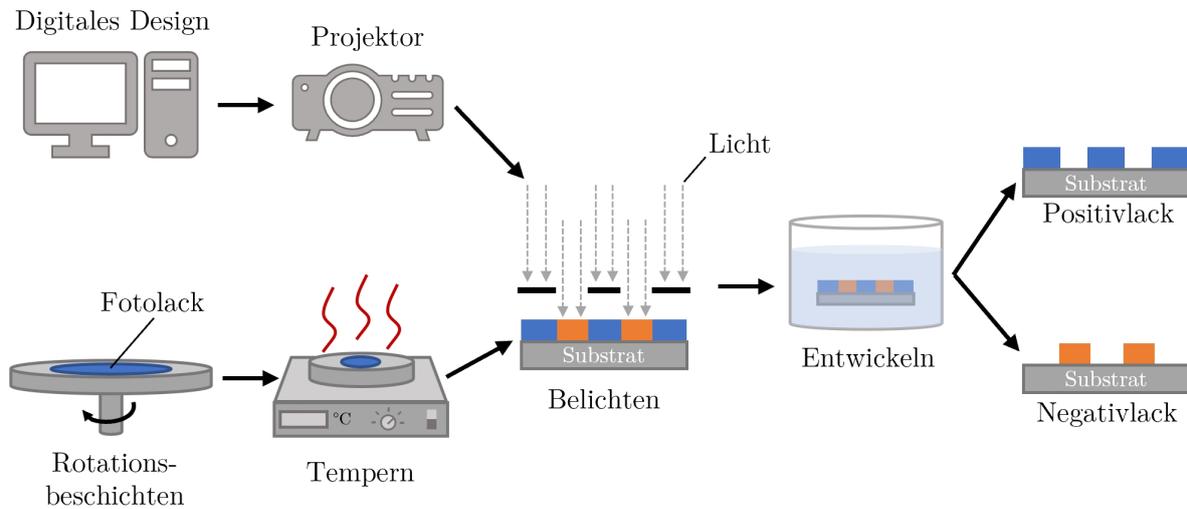
Durch die angelegte Spannung wird der austretende Strang der Polymerschmelze gedehnt und konstant in Richtung des Kollektors geleitet, womit Strangdurchmesser im unteren Mikrometerbereich erzielt werden können.[116] Durch die Steuerung der Bewegung des Druckkopfes in XY-Richtung ist es möglich sehr präzise komplexe Muster und Gewebe auf dem Kollektor abzulegen.

Für eine präzise Kontrolle der Umgebungsparameter wurde in dieser Arbeit als Gerät ein Eigenbau der Universität Würzburg verwendet, welcher mit einer Klimakammer ausgestattet ist (Temperatur zwischen 32 und 36°C, Luftfeuchtigkeit 60 % rH). Im Unterschied zum bereits beschriebenen statischen Elektrosponnen lag das PCL in diesem Verfahren als Schmelze vor (80 bis 100°C Schmelztemperatur) wobei der Abstand der Kanüle zum Kollektor mit 3,5 mm deutlich geringer war. Für die Faserherstellung wurde eine Hochspannung von 6,0 kV zwischen Kanüle und Kollektor angelegt. Das geschmolzene PCL wurde unter 100 kPa Luftdruck durch eine 25G Kanüle extrudiert während der Druckkopf sich zweidimensional über das Druckbett bewegte.

## 2.2.4 Photolithografische Herstellung von MEW-Kollektoren

Für die Herstellung der MEW-Kollektoren mit exakt definierter Steggeometrie wurde eine photolithografische Beschichtung von Silizium-Wafern verwendet. In diesem Verfahren wurde zuerst eine gleichmäßige Schicht eines photochemisch reaktiven Harzes auf die Oberfläche des Silizium-Wafers aufgebracht. Durch gezielte Belichtung bestimmter Bereiche mit definierter Wellenlänge wurde eine chemische Reaktion im aufgetragenen Harz

ausgelöst. Bei der Klassifizierung der Reaktion wird dabei in Positiv- und Negativlacke unterschieden, wie in Abbildung 2.3 dargestellt.



**Abbildung 2.3:** Schematische Darstellung der Prozessschritte in der photolithografischen Herstellung der strukturierten MEW-Kollektoren.

Bei Negativlacken führt die Belichtung dazu, dass in den Bereichen die dem Licht ausgesetzt sind, ein Quervernetzer aktiviert wird.[117] In einem zweiten Schritt führt dieser aktivierte Quervernetzer bei erhöhter Temperatur oder bei Raumtemperatur zur Verknüpfung von langkettigen Polymerbindungen. Dadurch werden die vernetzten Bereiche chemisch und thermisch stabiler als der unbelichtete Teil des Harzes. In einem anschließenden Entwicklungsbad werden die unvernetzten Bereiche chemisch aufgelöst und aus der Struktur entfernt. Übrig bleiben die zuvor belichteten Bereiche mit einem höheren Grad an Quervernetzung. Positivlacke funktionieren nach dem entgegengesetzten Prinzip. Das aufgetragene Harz weist zu Beginn bereits aktive Quervernetzer auf. Durch Belichtung werden diese Quervernetzer deaktiviert und damit im nachfolgenden Entwicklerbad chemisch instabil und löslich. Daher bleiben bei Positivlacken am Ende die unbelichteten Bereiche als stabile Strukturen auf der Oberfläche zurück.[117]

Für die Untersuchung des Fragmentierungsverhaltens von PCL während dem MEW-Prozess wurde eine Substratgeometrie mit kontinuierlich variierender Stegbreite und Abstandsweite gestaltet. Für die Herstellung dieser speziellen Kollektorgeometrien wurde ein Prozess auf Grundlage des Photolacks AZ 4562 (Microchemicals) entwickelt. Im ersten Schritt wurden dafür Silizium-Wafer in 15x20 mm große Quadrate geschnitten und für 15 Minuten in Piranha-Lösung gewaschen. Nach dem trocknen wurden die Silizium-Substrate für 15 Minuten im UV-Ozon-Reiniger behandelt. Für verbesserte Haftung des Fotolacks auf dem Substrat wurden zuerst 200 µl der Haftvermittlers TI PRIME (Microchemicals) für 20 Sekunden bei 3000 RPM per Rotationsbeschichtung aufgetragen und im Anschluss

für 2 Minuten bei 120°C gebacken. Nach dem Abkühlen wurden ca. 250 µl des Fotolacks AZ 4562 auf das Substrat aufgetragen und für 3 Sekunden bei 2000 RPM rotiert. Anschließend wurden die beschichteten Substrate für 30 Minuten bei 90°C getempert. Nach dem Abkühlen wurden die Proben für 30 Sekunden im Smart Print mit dem 1x Objektiv belichtet. Nach der Belichtung wurden die Proben für 40 Minuten im Entwicklerbad AZ 400K (Microchemicals) auf einem Orbitalschüttler entwickelt. Für eine erhöhte mechanische Stabilität wurden die Proben anschließend erneut für 50 Sekunden bei 115°C, 60 Sekunden bei 90°C und 120 Sekunden bei 60°C getempert. Nach der Abkühlung wurden die beschichteten Substrate für die Verwendung im MEW-Prozess gelagert.

### **2.2.5 Oberflächenmodifikation der PCL-Faserfragmente**

Zur Modifizierung der Oberfläche der PCL-Faserfragmente werden Plasmabehandlung, Beschichtung mit Fibronectin und Beschichtung mit Kollagen mit unbeschichteten Faserfragmenten verglichen.

#### **Plasmabehandlung**

Bei der Plasmabehandlung werden die Proben zunächst in einer Vakuumkammer positioniert. Nach Erreichen des erwünschten Kammerdrucks wird über Elektroden elektromagnetische Energie eingebracht und mit dem verbliebenen Gas ein stabiles Plasma erzeugt. Abhängig von der Zusammensetzung des Gasgemisches können unterschiedliche Oberflächeneffekte wie Reinigung, Funktionalisierung oder Aktivierung erzielt werden.[118] Die Plasmabehandlung von 100 mg PCL-Faserfragmenten wurde unter 0,2 mBar Kammerdruck mit einer Mischung aus 20 % Sauerstoff und 80 % Stickstoff durchgeführt. Dazu wurden die Proben auf Glasplättchen aufgebracht und auf dem Probenhalter in der Vakuumkammer positioniert. Nach 2 Minuten wurde ein Vakuum von 20 mBar erreicht. Anschließend wurde die Kammer mit Luft geflutet und erneut Vakuum gezogen bis 0,2 mBar erreicht wurden. Nach Erreichen des Arbeitsdrucks wurde die Plasmabehandlung bei 100 % Leistung für 1 Minute durchgeführt. Nach Ende der Plasmabehandlung wurde die Kammer erneut mit Luft geflutet und die Proben entnommen.

#### **Fibronectinbeschichtung**

Für die Beschichtung mit Fibronectin wurden 100 mg PCL-Faserfragmente im Dunkeln mit 1 ml L-DOPA gemischt und für 30 Minuten im Überkopfschüttler geschüttelt. Anschließend wurden die Proben zwei Mal mit PBS gewaschen und für zwei Stunden im

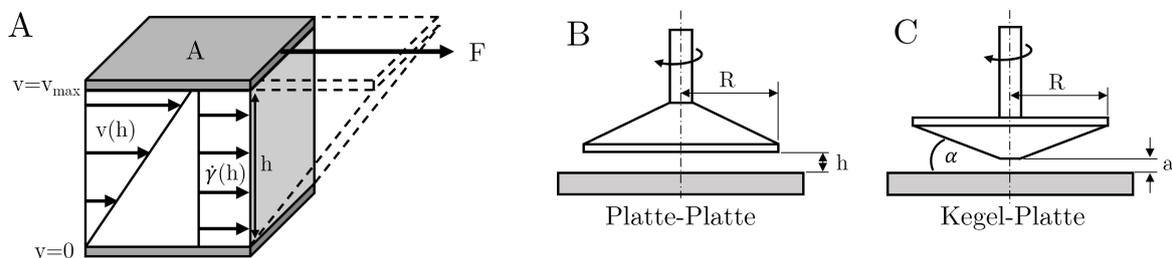
Überkopfschüttler bei 37°C in 1 ml Fibronektinlösung suspendiert. Die Proben wurden erneut zwei Mal mit PBS gewaschen und für die weitere Verwendung bei Dunkelheit und 4°C gelagert.

## Kollagenbeschichtung

Für die Kollagenbeschichtung wurden die Vliese oder vereinzelt Fragmente mit 10 % 1,6-Hexandiamin in 2-Propanol getränkt und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Proben wurden anschließend filtriert, mehrmals mit Milli-Q Wasser gewaschen und für 12 Stunden lyophilisiert. Die getrockneten Proben wurden mit 1 % Glutaraldehyd für eine Stunde getränkt. Die Proben wurden anschließend wiederholt mit Milli-Q Wasser gewaschen und für 48 Stunden in eine 2,5 mg/ml Kollagenlösung bei pH 3,4 überführt und bei 2°C bis 4°C gerührt. Danach wurden die Proben ein weiteres mal filtriert, einmal mit 0,1 % Essigsäure gespült und mit Milli-Q Wasser gewaschen bis ein neutraler pH-Wert erreicht wurde. Bis zur Verwendung wurden die Proben im Kühlschrank gelagert, jedoch maximal für 72 Stunden.

### 2.2.6 Scherrheologische Messungen

Für die Charakterisierung des Fließverhaltens von Lösungen und Hydrogelen können unterschiedliche rheologische Messungen durchgeführt werden. Die hier angewandte Methode der Scherrheologischen Untersuchung in einem Rotationsrheometer basiert auf dem Prinzip des Zwei-Platten-Modells. In diesem Modell wird die Probe zwischen zwei parallelen Platten mit der definierten Fläche  $A$  der Oberen Platte und dem Abstand  $h$  positioniert. Die obere Platte wird nun mit einer Kraft  $F$  parallel zur unteren Platte rotiert und deren resultierende Geschwindigkeit gemessen, wie in Abbildung 2.4-A dargestellt.



**Abbildung 2.4:** Schematische Darstellung des rheologischen Zwei-Platten-Modells und der entsprechenden Messgeometrien. A: Zwei-Platten-Modell, die obere Platte wird durch eine Kraft  $F$  horizontal bewegt während die untere Platte in Ruhe bleibt. B: Darstellung der Platte-Platte Geometrie und deren Parameter Radius ( $R$ ) und Plattenabstand ( $h$ ). C: Darstellung der Kegel-Platte Geometrie und deren Parameter Radius ( $R$ ), Spaltabstand ( $a$ ) und Kegelwinkel ( $\alpha$ ).

Dies kann in der Praxis in Form einer Platte-Platte-(Abb. 2.4-B) oder einer Kegel-Platte-Geometrie realisiert werden (Abb. 2.4-C). Die untere Platte bleibt unbewegt mit einer Geschwindigkeit  $v = 0$ , was zur Scherung der Probe im Spalt zwischen den beiden Platten führt. Als Randbedingung wird angenommen, dass die Probe perfekt an den beiden Platten adhärirt (Randhaftbedingung) und sich ein laminares Strömungsprofil ausbildet. Die erzeugte Scherspannung kann damit berechnet werden als

$$\tau = \frac{F}{A} \quad (2.1)$$

Mit der Scherkraft  $F$ , die auf die Fläche  $A$  wirkt. Als weitere Größe ist die Scherrate  $\dot{\gamma}$  definiert als

$$\dot{\gamma} = \frac{v}{h} \quad (2.2)$$

Mit der Geschwindigkeit der Platte  $v$  und dem Abstand der Platten  $h$ . Basierend auf der Scherrate  $\dot{\gamma}$  und der Scherspannung  $\tau$  wird die Scherviskosität definiert als

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (2.3)$$

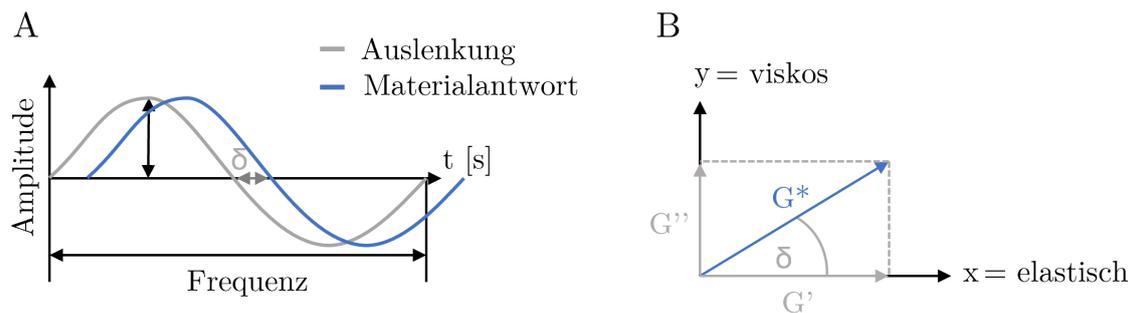
Diese Größe kann herangezogen werden, um den Einfluss von intermolekularen Wechselwirkungen in Lösungen, Schmelzen oder Suspensionen auf das makroskopische Fließverhalten der Probe zu beschreiben. Mit Einführung der Dichte der Lösung  $\rho$ , wird die kinematische Viskosität  $\nu$  definiert als

$$\nu = \frac{\eta}{\rho} \quad (2.4)$$

Diese Bestimmung der Viskosität von Flüssigkeiten basiert auf dem Gesetz von Newton. Für die Beschreibung von Feststoffen wird nach Hooke das Schermodul  $G$  ermittelt durch

$$G = \frac{\tau}{\gamma} \quad (2.5)$$

Im Falle einer oszillatorischen Messung sind Frequenz und Amplitude die Messparameter der zeitabhängigen Materialantwort. Der Winkelversatz  $\delta$  wird durch den Unterschied zwischen der Anregung der Probe durch die Geometrie (Vorgabe) und der resultierenden Materialantwort (Ergebnis) ermittelt. Aus diesem können die zeitabhängigen Anteile des komplexen Moduls bestimmt werden. Dabei kann der komplexe Modul in der gaußschen Zahlenebene in den Anteil der elastischen Materialantwort (Speichermodul) und der viskosen Materialantwort (Verlustmodul) unterteilt werden. Der Zusammenhang beider Moduln über den Winkelversatz  $\delta$  ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Für die Darstellung des komplexen Moduls in der Gaußschen Zahlenebene ergibt sich durch Verwendung von  $\delta$  eine Aufteilung in Real- und Imaginärteil, womit Speicher- und Verlustmodul grafisch bestimmt werden können.



**Abbildung 2.5:** Zeitabhängiges Verhalten bei rheologischen Messungen. A: Phasenverschiebung von Vorgabe- und Ergebniskurve um den Winkel  $\delta$  bei oszillatorischer Messung. B: Aufteilung des komplexen Moduls  $G^*$  in seinen elastischen (Speichermodul  $G'$ ) und viskosen Anteil (Verlustmodul  $G''$ ).

Für alle rheologischen Messungen wurde ein Rotationsrheometer DHR-2 von TA Instruments (DE, USA) verwendet. Für die Untersuchung der Spinnlösungen wurde eine Kegelplatte Geometrie mit 40 mm Durchmesser, einem Winkel von  $0,5^\circ$ , einem Trunkierungsspalt von  $11 \mu\text{m}$  und einem Probenvolumen von  $140 \mu\text{l}$  eingesetzt. Diese Messungen wurden in einem stationären Strömungszustand in einem Scherratenbereich von  $0,01 \text{ 1/s}$  bis  $1000 \text{ 1/s}$  bei  $25^\circ\text{C}$  durchgeführt. Dabei wurden 10 Messpunkte pro Dekade bei einer maximalen Messzeit von 2 Minuten pro Einzelpunkt und maximal 5% Abweichung ermittelt.

Für die Untersuchung der verstärkten und unverstärkten Hydrogele wurde eine Platte-Platte Geometrie mit 40 mm Durchmesser und einem Messspalt von  $500 \mu\text{m}$  verwen-

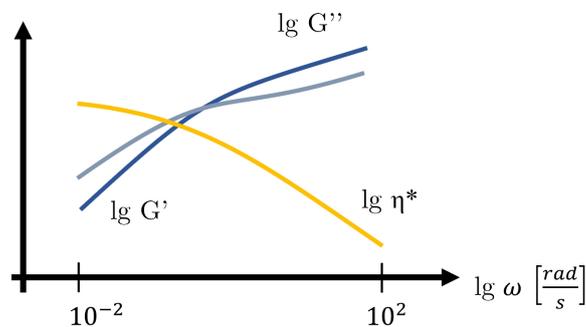
det. Die Temperatur betrug bei allen Messungen 25 °C und wurde mittels eines Peltier-Elements in der unteren Platte eingestellt. Um Trocknungseffekte am Rand der Proben zu vermeiden, wurde eine mit PBS befeuchtete Lösungsmittelfalle installiert. Die Messprozedur wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und besteht aus fünf aufeinanderfolgenden Messschritten.

### Schritt 1: Probenkonditionierung bei 25 °C für 180 Sekunden

Im ersten Schritt wurden alle Proben auf eine konstante Temperatur gebracht, um identische Ausgangsbedingungen für alle folgenden Messschritte zu gewährleisten.

### Schritt 2: Oszillatorischer Frequenztest

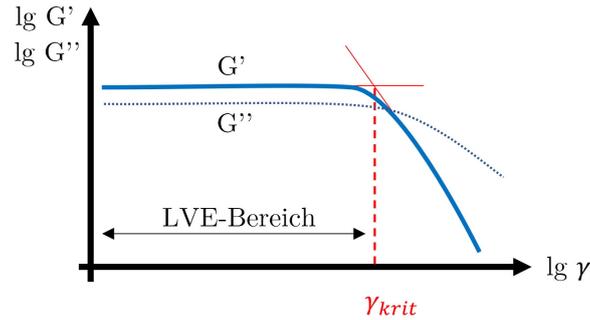
Für den oszillatorischen Frequenztest (Abb. 2.6) wurde die Amplitude (ermittelt durch Vorversuche) abhängig vom untersuchten Hydrogel so gewählt, dass die Messung im linear viskoelastischen Bereich stattfindet. Für die meisten Materialien war eine Amplitude von 1 % geeignet. Die Kreisfrequenz wurde dabei von 0,1 rad/s bis 100 rad/s gesteigert. Die resultierenden Daten bilden die Grundlage für die rheologische Modellierung.



**Abbildung 2.6:** Scherverdünnendes Verhalten der komplexen Viskosität im oszillatorischen Frequenztest.

### Schritt 3: Oszillatorischer Amplitudentest

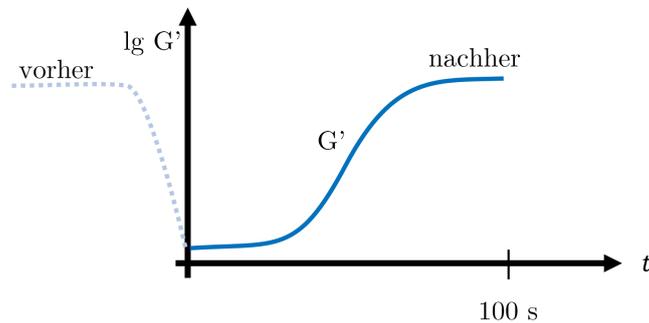
Beim oszillatorischen Amplitudentest (Abb. 2.7) wurde die Amplitude, bei einer konstanten Kreisfrequenz von 10 rad/s, von 0,01 % auf 200 % gesteigert. Nach DIN 51810-2 ist das Ende des linear-viskoelastischen Bereichs erreicht, wenn der Wert des Speichermoduls um mehr als 10 % vom seinem Plateau-Wert ( $\gamma_{krit}$ ) bei kleinen Amplituden abweicht.



**Abbildung 2.7:** Scherverdünnendes Verhalten von  $G'$  und  $G''$  im oszillatorischen Amplitudentest. Der linear-viskoelastische Bereich (LVE) endet bei überschreiten von  $\gamma_{krit}$ .

#### Schritt 4: Erholungsschritt

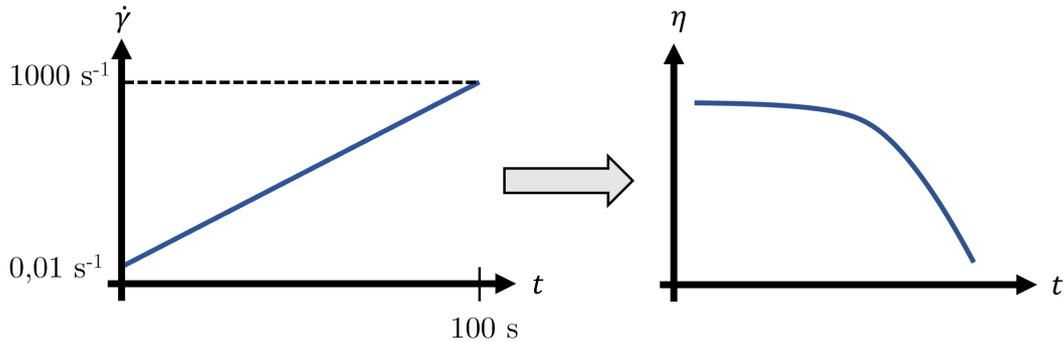
Zur Bestimmung des Regenerationsverhaltens (Abb. 2.8) wird die Probe 180 Sekunden lang mit 10 rad/s und einer Amplitude von 0,1% belastet. Dadurch ist es möglich, die Plateauwerte vor und nach der Belastung im Amplitudentest zu vergleichen und die Geschwindigkeit bis zum Erreichen des endgültigen Plateauwertes zu messen.



**Abbildung 2.8:** Verhalten des Speichermoduls im Erholungsschritt. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  s endet die Belastung aus dem vorherigen Messschritt und das Schubmodul kann sich auf einen neuen Plateau-Wert erholen.

#### Schritt 5: Rotationsfließtest

Als letzter Schritt wird ein Rotationstest (Abb. 2.9) im Scherratenbereich von 0,01 1/s bis 1000 1/s für 100 Sekunden durchgeführt.



**Abbildung 2.9:** Im Rotationsfließtest wird eine Rampe im Scherratenbereich von 0,01 1/s bis  $1000 \text{ s}^{-1}$  gefahren und der Einfluss der Scherspannung auf die Viskosität untersucht.

## 2.2.7 Modelle zur Beschreibung rheologischer Messungen

Rheologische Messungen können mit Hilfe mathematischer Modelle vereinfacht angenähert werden. Die bekanntesten Modelle zur Beschreibung von Viskositätsmessungen sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Diese Modelle dienen zur Beschreibung und Vorhersage der Verformbarkeit von Werkstoffen. Die Modelle nach Power-Law, Carreau-Yasuda und Cross gehören zu den drei am häufigsten verwendeten Modellen in diesem Bereich.

Modell	Gleichung
Power-Law	$\eta(\dot{\gamma}) = c \cdot \dot{\gamma}^p$
Cross	$\eta(\dot{\gamma}) = \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{1 + (c \cdot \dot{\gamma})^p} + \eta_\infty$
Carreau-Yasuda	$\eta(\dot{\gamma}) = \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{[1 + (\lambda \cdot \dot{\gamma})^{p_1}]^{\frac{(1-p)}{p_1}}} + \eta_\infty$

**Tabelle 2.1:** Übersicht über die gebräuchlichsten Modelle zur Beschreibung rheologischer Messungen. Die Modelle von Power-Law, Cross und Carreau-Yasuda sind mit den entsprechenden Gleichungen aufgeführt.

Das Power-Law Modell mit dem Fließkoeffizient  $c$  [Pa · s] und dem Power-Law-Index  $p$  beschreibt die Verformbarkeit von Materialien als proportional zur Dehnrates.[119, 120] Es ist aufgrund der geringen Parameteranzahl vergleichsweise einfach in der Anwendung

und eignet sich gut für Materialien mit konstanter Viskosität wie flüssige Klebstoffe. Mit diesem Modell kann einfaches idealviskoses ( $p = 1$ ), scherverdünnendes ( $p < 1$ ) und scherverdickendes ( $p > 1$ ) Verhalten beschrieben werden.

Das Cross Modell mit der Cross-Konstanten  $c$  [s] und der Cross- Hochzahl  $p$  beschreibt die Verformbarkeit von Materialien mit zähelastischen Eigenschaften. B. Kautschuk und Schaumstoffe.[121] Es berücksichtigt sowohl die sich verändernde Viskosität, als auch die Elastizität des Materials und verwendet die Null-Viskosität  $\eta_0$  sowie die Unendlich-Viskosität  $\eta_\infty$ .

Das Carreau-Yasuda Modell der Yasuda-Hochzahl  $p_1$ , der Relaxationszeit  $\lambda$  [s] und dem Power-Law-Index  $p$  erweitert das Power-Law Modell und beschreibt die Verformbarkeit von Materialien mit sich ändernder Viskosität.[122] Es ist geeignet für Materialien mit nicht-Newtonscher Viskosität wie Polymerlösungen und Gele. Diese Modelle werden häufig in der Polymer- und Chemieindustrie sowie in der medizinischen Forschung und Entwicklung verwendet. Die Wahl des geeigneten Modells hängt von den spezifischen Eigenschaften des zu untersuchenden Materials ab.

## 2.2.8 Linear-Viskoelastische Modellierung

Der linear-viskoelastischen Modellierung werden die rheologischen Messungen des Speicher- und Verlustmoduls zu Grunde gelegt. Dabei sind Ergebnisse aus dem oszillatorischen Frequenztest von besonderem Interesse, da hier die genannten Moduln in Abhängigkeit der Kreisfrequenz  $\omega$  dargestellt werden. Die Deformation der oszillatorischen Messung wird vorgegeben durch die Funktion

$$\varepsilon(t) = \tilde{\varepsilon} \cdot \sin(\omega t) \quad (2.6)$$

mit der bekannten Amplitude der Deformation  $\tilde{\varepsilon}$  eines Scherrheometers.[123] Daraus kann die entstehende Spannung  $\sigma$  nach folgender Funktion berechnet werden.

$$\sigma(t) = G'(\omega) \cdot \tilde{\varepsilon} \cdot \sin(\omega t) + G''(\omega) \cdot \tilde{\varepsilon} \cdot \cos(\omega t) \quad (2.7)$$

Aus diesen Gleichungen ist es möglich auch die erste und zweite Ableitung für  $\varepsilon(t)$  und  $\sigma(t)$  zu bestimmen:

$$\dot{\varepsilon}(t) = \tilde{\varepsilon} \cdot \omega \cdot \cos(\omega t) \quad (2.8)$$

$$\ddot{\varepsilon}(t) = -\tilde{\varepsilon} \cdot \omega^2 \cdot \sin(\omega t) = -\omega^2 \cdot \varepsilon(t) \quad (2.9)$$

$$\dot{\sigma}(t) = G'(\omega) \cdot \tilde{\varepsilon} \cdot \omega \cdot \cos(\omega t) - G''(\omega) \cdot \tilde{\varepsilon} \cdot \omega \cdot \sin(\omega t) \quad (2.10)$$

$$\ddot{\sigma}(t) = -G'(\omega) \cdot \tilde{\varepsilon} \cdot \omega^2 \cdot \sin(\omega t) - G''(\omega) \cdot \tilde{\varepsilon} \cdot \omega^2 \cdot \cos(\omega t) = -\omega^2 \cdot \sigma(t) \quad (2.11)$$

Die Periodizität der Gleichungen 2.6 bis 2.11 ermöglicht es, ausreichende Informationen durch Messungen über eine Periode zu gewinnen, um die entsprechenden Daten für  $\varepsilon(t_i)$ ,  $\dot{\varepsilon}(t_i)$ ,  $\ddot{\varepsilon}(t_i)$ ,  $\sigma(t_i)$ ,  $\dot{\sigma}(t_i)$  und  $\ddot{\sigma}(t_i)$  zu generieren. Hierbei repräsentiert der Index  $i$  die Datenerfassung über eine Periode hinweg. Eine Messung über 10 Zeitschritte  $t_i$  ist ausreichend und kann beliebig gewählt werden. Allerdings muss dies für jede angewandte Winkelfrequenz  $\omega_j$  geschehen. Somit entspricht  $t_{ij}$ :

$$t_{ij} = i \cdot \frac{2\pi}{\omega_j} \cdot \frac{1}{10} \quad (2.12)$$

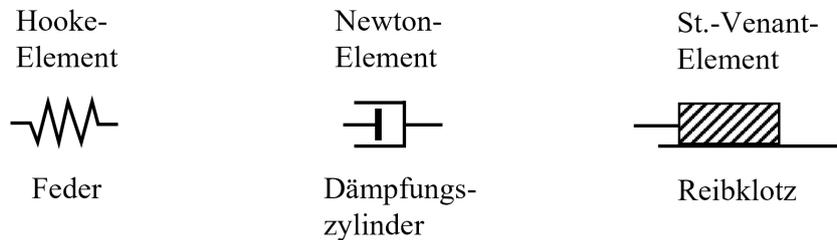
wobei  $i$  von 0 bis 9 definiert wird, während mit  $j$  nur die spezifische Winkelfrequenz  $\omega_j$  angegeben wird. Daraus folgt eine Datenstruktur nach Tabelle 2.2:

$\varepsilon$	$\dot{\varepsilon}$	$\ddot{\varepsilon}$	$\sigma$	$\dot{\sigma}$	$\ddot{\sigma}$	$\omega$
$\varepsilon(t_{11})$	$\dot{\varepsilon}(t_{11})$	$\ddot{\varepsilon}(t_{11})$	$\sigma(t_{11})$	$\dot{\sigma}(t_{11})$	$\ddot{\sigma}(t_{11})$	$\omega_1$
$\varepsilon(t_{21})$	$\dot{\varepsilon}(t_{21})$	$\ddot{\varepsilon}(t_{21})$	$\sigma(t_{21})$	$\dot{\sigma}(t_{21})$	$\ddot{\sigma}(t_{21})$	$\omega_1$
...	...	...	...	...	...	...
$\varepsilon(t_{91})$	$\dot{\varepsilon}(t_{91})$	$\ddot{\varepsilon}(t_{91})$	$\sigma(t_{91})$	$\dot{\sigma}(t_{91})$	$\ddot{\sigma}(t_{91})$	$\omega_1$
$\varepsilon(t_{12})$	$\dot{\varepsilon}(t_{12})$	$\ddot{\varepsilon}(t_{12})$	$\sigma(t_{12})$	$\dot{\sigma}(t_{12})$	$\ddot{\sigma}(t_{12})$	$\omega_2$
$\varepsilon(t_{22})$	$\dot{\varepsilon}(t_{22})$	$\ddot{\varepsilon}(t_{22})$	$\sigma(t_{22})$	$\dot{\sigma}(t_{22})$	$\ddot{\sigma}(t_{22})$	$\omega_2$
...	...	...	...	...	...	...
$\varepsilon(t_{92})$	$\dot{\varepsilon}(t_{92})$	$\ddot{\varepsilon}(t_{92})$	$\sigma(t_{92})$	$\dot{\sigma}(t_{92})$	$\ddot{\sigma}(t_{92})$	$\omega_2$
...	...	...	...	...	...	...
...	...	...	...	...	...	$\omega_{\max}$

**Tabelle 2.2:** Datenstruktur aus der Berechnung der rheologischen Messungen.

Anhand dieser mathematischen Beziehungen können sukzessive verschiedene rheologische Modellsysteme durch die Modellierung von  $\sigma$  als Funktion von  $\varepsilon$ ,  $\dot{\varepsilon}$ ,  $\ddot{\varepsilon}$ ,  $\dot{\sigma}$  und  $\ddot{\sigma}$  bewertet werden, wobei nicht immer alle Elemente als sogenannte Haupteffekte zur Materialantwort beitragen. Zum besseren Verständnis werden die gängigsten rheologischen Modellsysteme im Folgenden Abschnitt kurz erläutert. Als Grundlage dienen verschiedene rheologische

Modelle, die durch Reihen- oder Parallelschaltung von Grundelementen erstellt werden. Die verwendeten Grundelemente für Materialantworten auf definierte Belastung sind das Hooke-Element (Federelement), das Newton-Element (Dämpfungszyylinder) und das St-Venant-Element (Reibklotz) wie in Abbildung 2.10 dargestellt.



**Abbildung 2.10:** Symbolische Darstellung der drei Grundelemente zu Beschreibung des rheologischen Verhaltens von Materialien.

Dabei repräsentiert das Hooke-Element einen ideal elastischen Körper, der sich bei einer aufgetragenen Spannung  $\sigma$  nach dem Hookeschen Gesetz verhält:

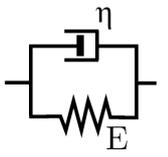
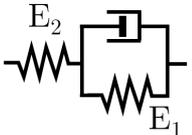
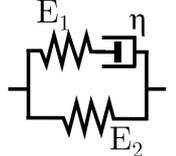
$$\sigma = E \cdot \varepsilon \quad (2.13)$$

Mit der einwirkenden Spannung  $\sigma$ , der Materialkonstante  $E$  als Elastizitätsmodul eines idealen Festkörpers und der Deformation  $\varepsilon$ . Die ideale Viskosität des Newton-Elements wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\sigma = \eta \cdot \dot{\varepsilon} \quad (2.14)$$

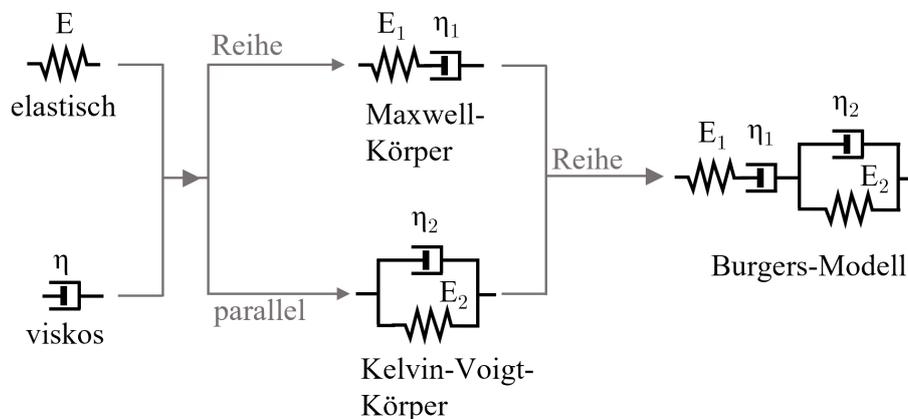
Dabei wird eine zur Spannung  $\sigma$  proportionale Deformationsgeschwindigkeit  $\dot{\varepsilon}$  durch die dynamische Viskosität  $\eta$  bestimmt. Die ideale Plastizität (St.-Venant-Element) ist definiert durch eine Fließgrenze  $\sigma_F$  unterhalb derer keine Deformation erfolgt. Bei Überschreitung der Fließgrenze beginnt die zeitunabhängige irreversible Verformung des Körpers.

Durch Reihen- und Parallelschaltung dieser einfachen Grundelemente können komplexere und realitätsnähere Modelle konstruiert werden. Die am häufigsten verwendeten Modelle mit zwei oder drei Parametern sind in Tabelle 2.3 dargestellt. Für lineare Zusammenhänge von Scherstress  $\sigma$  als Funktion von  $\dot{\varepsilon}$  und  $\sigma$  ist das Maxwell-Modell gut geeignet. Bei einer Abhängigkeit von  $\varepsilon$  und  $\dot{\varepsilon}$  findet meist das Kelvin-Voigt-Modell Anwendung.

Modell	Darstellung	Differenzialgleichung
Maxwell		$\sigma = \eta \dot{\epsilon} - \frac{\eta}{E} \ddot{\sigma}$ $\sigma = K_1 \dot{\epsilon} + K_2 \ddot{\sigma}$
Kelvin-Voigt		$\sigma = E \epsilon + \eta \dot{\epsilon}$ $\sigma = K_1 \epsilon + K_2 \dot{\epsilon}$
Zener K		$\sigma = \frac{E_1 E_2}{E_1 + E_2} \epsilon + \frac{E_2 \eta}{E_1 + E_2} \dot{\epsilon} - \frac{\eta}{E_1 + E_2} \ddot{\sigma}$ $\sigma = K_1 \epsilon + K_2 \dot{\epsilon} + K_3 \ddot{\sigma}$
Zener M		$\sigma = E_2 \epsilon + \frac{\eta(E_1 + E_2)}{E_1} \dot{\epsilon} - \frac{\eta}{E_1} \ddot{\sigma}$ $\sigma = K_1 \epsilon + K_2 \dot{\epsilon} + K_3 \ddot{\sigma}$

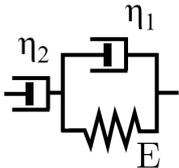
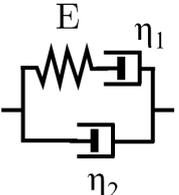
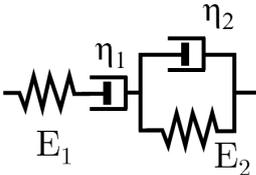
**Tabelle 2.3:** Übersicht der am häufigsten verwendeten rheologischen Modelle und Angabe der entsprechenden Differenzialgleichung für 2 oder 3 maßgebliche Einflussgrößen.

In dieser Arbeit wird das rheologische Verhalten von faserverstärkten Hydrogelen vorrangig mit Hilfe des Burgers-Modells untersucht, welches sich, wie in Abbildung 2.11 ersichtlich, aus einer Reihenschaltung eines Maxwell- und eines Kelvin-Voigt-Körpers zusammensetzt.



**Abbildung 2.11:** Entwicklung der Burgers-Modell aus einer Reihenschaltung eines Maxwell-Körpers und eines Kelvin-Voigt-Körpers.

Der Maxwell-Körper wird mathematisch definiert durch die Annahmen, dass die Gesamtdeformation der Summe der Einzeldeformationen entspricht und auf beide Komponenten dieselbe Schubspannung wirkt. Für den Kelvin-Voigt-Körper gilt die Annahme, dass sich die Gesamt-Schubspannung auf beide Modellkomponenten verteilt und die Deformation der Einzelkomponenten gleich groß ist. Ein Vergleich der Modelle von Lethersich, Jeffreys oder Burgers kann Tabelle 2.4 entnommen werden.

Modell	Darstellung	Differenzialgleichung
Lethersich		$\sigma = \eta_2 \dot{\epsilon} + \frac{\eta_1 \eta_2}{E} \ddot{\epsilon} - \frac{\eta_1 + \eta_2}{E} \dot{\sigma}$ $\sigma = K_1 \dot{\epsilon} + K_2 \ddot{\epsilon} + K_3 \dot{\sigma}$
Jeffreys		$\sigma = (\eta_1 + \eta_2) \dot{\epsilon} + \frac{\eta_1 \eta_2}{E} \ddot{\epsilon} - \frac{\eta_1}{E} \dot{\sigma}$ $\sigma = K_1 \dot{\epsilon} + K_2 \ddot{\epsilon} + K_3 \dot{\sigma}$
Burgers		$\sigma = \eta_1 \dot{\epsilon} + \frac{\eta_1 \eta_2}{E_2} \ddot{\epsilon} - \left( \frac{E_1 \eta_1 + E_1 \eta_2 + E_2 \eta_1}{E_1 E_2} \right) \dot{\sigma} - \frac{\eta_1 \eta_2}{E_1 E_2} \ddot{\sigma}$ $\sigma = K_1 \dot{\epsilon} + K_2 \ddot{\epsilon} + K_3 \dot{\sigma} + K_4 \ddot{\sigma}$

**Tabelle 2.4:** Übersicht der am häufigsten verwendeten rheologischen Modelle und Angabe der entsprechenden Differenzialgleichung für 3 oder 4 maßgebliche Einflussgrößen.

Durch die Bestimmung der Modellparameter  $K_i$  können die einzelnen Materialparameter  $E_i$  und  $\eta_i$  bestimmt werden. Dies geschieht durch Lösen des Gleichungssystems mithilfe des Koeffizientenvergleichs der linearen Gleichungen und der  $\sigma$ -Form der Differentialgleichungen. Die einzelnen K-Parameter können durch ein lineares Regressionsmodell bestimmt werden, das die auftretende Beanspruchung  $\sigma$  mit den relevanten Haupteffekten (aus Tabelle 2.3 und 2.4) korreliert. Für diese Auswertung können statistische Softwarepakete wie Statistica, Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) oder Excel verwendet werden.

Darüber hinaus kann die aus der linearen Regression gewonnene theoretische Spannung, auch als berechnete Spannung bezeichnet, mit den vom Rheometer gemessenen realen Spannungen verglichen werden. Bei Verwendung des Burgers-Modells ergeben sich beispielsweise die folgenden Beziehungen:

$$K_1 = \eta_1 \quad (2.15)$$

$$K_2 = \frac{\eta_1 \eta_2}{E_2} \quad (2.16)$$

$$K_3 = - \left( \frac{E_1 \eta_1 + E_1 \eta_2 + E_2 \eta_1}{E_1 E_2} \right) \quad (2.17)$$

$$K_4 = - \frac{\eta_1 \eta_2}{E_1 E_2} \quad (2.18)$$

Durch Lösen des resultierenden Gleichungssystems können die einzelnen Modellparameter für das Burgers-Modell wie folgt berechnet werden:

$$E_1 = - \frac{K_2}{K_4} \quad (2.19)$$

$$E_2 = \frac{E_1 K_1}{-K_3 E_1 - \frac{E_1 K_2}{K_1} - K_1} \quad (2.20)$$

$$\eta_1 = K_1 \quad (2.21)$$

$$\eta_2 = \frac{K_2 E_2}{K_1} \quad (2.22)$$

Der hier vorgestellte Ansatz ist sowohl einfach zu handhaben als auch auf vorhandene scherrheologische Daten anwendbar, die in der Literatur weithin verfügbar sind. Theoretisch enthalten die resultierenden Parameter Informationen über die strukturelle Integrität von Hydrogelsträngen nach dem 3D-Druck.

## 2.2.9 Herstellung der Hydrogele

Für den Vergleich des Fließverhaltens beim 3D-Druck mit dem rheologischen Verhalten wurden drei verschiedene Hydrogele mit unterschiedlichen Faserkonzentrationen für die Verstärkung untersucht.

### Alginate

Alginate PH176 wurde bezogen von Vivapharm (JRS Pharma GmbH). Für die Herstellung von 10 ml Lösung mit 3% w/v wurden 300 mg Alginate in Pulverform abgewogen und unter kontinuierlichem Rühren langsam in ca. 8 ml deionisiertem Wasser aufgelöst. Anschließend wurde die Lösung auf das Volumen von 10 ml aufgefüllt. Bis zur Verwendung wurde die

Lösung bei 4 °C gelagert.

## **Pluronic**

Poloxamer 407 (Pluronic™ F127) wurde bezogen von Sigma Aldrich (Merck KGaA). Für die Herstellung von 10 ml Hydrogel mit 20 % w/v wurden 2,0 g Poloxamer mit ca. 8 ml deionisiertem Wasser bei 4 °C eingerührt. Die Lösung wurde bei 4 °C über Nacht gerührt und am nächsten Tag auf 10 ml aufgefüllt. Bis zur Verwendung wurde die Lösung bei 4 °C gelagert.

## **Hydrogel aus Spinnenseidenprotein eADF4(C16)**

Das hier verwendete Spinnenseidenprotein eADF4(C16) wurde rekombinant produziert und vom Lehrstuhl Biomaterialien der Universität Bayreuth zur Verfügung gestellt. Es besteht aus 16 Wiederholungen des sogenannten C-Moduls, welches aus dem Genom der Gartenkreuzspinne *Araneus Diadematus* stammt. Für die Herstellung der Hydrogele wurde das lyophilisierte Seidenprotein für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 6 M Guanidinthiocyanat gelöst. Diese Lösung wurde anschließend sterilfiltriert (0,2 µm) und mit Hilfe einer Dialysemembran (MWCO bei 6-8 kDa) gegen 10 mM Tris/HCL dialysiert. Um die Proteinkonzentration zu erhöhen, wurde eine zweite Dialyse gegen 25 % w/v Polyethylenglykol (Molekulargewicht 20000 g/mol) mit Dialysemembranen gleichen Typs (MWCO bei 6-8 kDa) durchgeführt bis die finale Konzentration von 3 % w/v mittels NanoDrop UV-Vis Spektrophotometers (Thermo Scientific) bestätigt wurde. Anschließend wurden die Lösungen in Kartuschen gefüllt und gelierten bei 37 °C im Überkopfschüttler über Nacht.

### **2.2.10 3D-Extrusionsdruck von Hydrogelen**

Für den 3D-Druck der verstärkten und unverstärkten Hydrogele wurde ein extrusionsbasierter Biodrucker (Inkredibile™, Cellink) verwendet. Die Druckerkartuschen wurden 20 Minuten vor dem Druck auf 25 °C aufgeheizt und mit 21G-Kanülen (Innendurchmesser: 0,51 mm, Aussendurchmesser: 0,82 mm, Länge: 12,7 mm) ausgestattet. Die Druckparameter wurden auf die einzelnen Proben angepasst um vergleichbare Durchsätze mit allen Materialien zu gewährleisten. Alle Proben wurden bei 25 °C Raumtemperatur verarbeitet.

Zur Bestimmung des Durchsatzes der unterschiedlichen Proben wurde jede Probe bei zwei angelegten Drücken für 10 Sekunden in ein Wägeschälchen extrudiert und anschlie-

ßend gewogen. Dieser Vorgang wurde für beide Drücke drei Mal durchgeführt, woraus ein Durchschnittswert für den jeweiligen Durchsatz ermittelt wurde. Die gewählten Drücke lagen dabei mindestens 15 kPa auseinander, der untere Druck wurde festgelegt als derjenige, bei dem die Fließgrenze erstmals überschritten wurde und eine kontinuierliche Extrusion beobachtet werden konnte.

### **2.2.11 Rasterelektronenmikroskopie**

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) verwendet einen fokussierten Elektronenstrahl, um die Oberfläche fester Proben im Vakuum zu untersuchen. Dabei sind sehr hohe Vergrößerungen bis in den Bereich weniger Nanometer möglich. Im Inneren der Elektronenkanone werden die Elektronen von der Glühkathode emittiert und beschleunigt. Die austretenden Elektronen werden durch magnetische Linsen zu einem präzisen Strahl gebündelt und auf die Probe gerichtet. Da der gesamte Prozess in einer Vakuumkammer stattfindet, können störende Wechselwirkungen mit anderen Molekülen und Atomen im Bereich des Elektronenstrahls stark reduziert werden. Zur Erzeugung eines Bildes wird der Elektronenstrahl in einem Raster über die Probenoberfläche geführt. Dabei kommt es zu den nachfolgend beschriebenen Wechselwirkungen zwischen dem Elektronenstrahl und der Probenoberfläche, die genutzt werden können, um Aussagen über die Oberflächenstruktur, die chemische Zusammensetzung und mögliche Kristallorientierungen zu treffen. Dazu gehören gebeugte und ungebeugte rückgestreute Elektronen (EBSD und BSE), Photonen im Röntgenbereich (kontinuierliche und charakteristische Röntgenstrahlung für die Elementaranalyse) und im sichtbaren Bereich (Kathodolumineszenz), Wärmestrahlung und Sekundärelektronen. Durch den Einsatz verschiedener Detektoren können die unterschiedlichen Signale erfasst werden. Da es sich beim REM um ein zerstörungsfreies Verfahren handelt, können Proben mehrfach verwendet und analysiert werden.

Eine wichtige Voraussetzung für die Erzeugung hochauflösender Bilder ist eine hohe elektrische Leitfähigkeit der Probenoberfläche. Da organische Proben und Polymere in der Regel nur eine begrenzte Leitfähigkeit besitzen, müssen solche Proben zunächst getrocknet und anschließend durch Sputtern leitfähig gemacht werden. Beim Sputtern wird durch die Erzeugung eines Plasmas eine wenige Nanometer dünne Schicht aus elektrisch leitfähigem Material wie Gold, Platin oder Graphit auf der Probenoberfläche abgeschieden.

Die hier untersuchten Proben wurden mit Hilfe von doppelseitig klebenden Kohlenstoffplättchen auf Probentellern aus Aluminium befestigt und mit einer 2 nm dicken Platinschicht bedampft. Für die Aufnahmen wurde ein Apreo Volumescop (FEI/Thermo Scientific) mit Everhart-Thornley-Detektor im Hochvakuum im Standardmodus mit einer Beschleunigungsspannung von 2 kV und einem Arbeitsabstand von 10 mm verwendet. Die

EDX-Messungen wurden mit einem Zeiss Leo 1530 (Zeiss) mit UltraDry EDS-Detektor im Niedervakuum und einer Beschleunigungsspannung von 1,0 kV im charakteristischen Energiebereich von 0-1100 eV durchgeführt.

### **2.2.12 Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie**

Die Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR) ist eine der am weitesten verbreiteten nicht-destruktiven Analysemethoden der Biochemie. Während der Messung wird die Probe (fest, flüssig oder gasförmig) mit Licht im infraroten Wellenlängenbereich (800 nm bis 1 mm) bestrahlt und die Absorption bzw. die Transmission bei einzelnen Wellenlängen ermittelt. Dabei werden permanente oder transiente Dipol-Momente angeregt, die die Energie der IR-Strahlung in Bewegung bzw. Wärme umwandeln und damit dem Spektrum entziehen. Der verwendete nachgeschaltete Detektor nimmt ein Interferogramm auf und übermittelt diese Informationen an einen Computer. Dort wird die mathematische Operation der Fourier-Transformation auf das Signal angewendet, um ein wellenlängenabhängiges Spektrum zu generieren. Durch einen vorherigen Hintergrundscan kann das Hintergrundrauschen dieses Signals deutlich reduziert werden und die ermittelten Spektren werden vergleichbar. Die absorbierten Wellenlängen können durch Wissen aus der Literatur und aus umfangreichen Datenbanken den jeweiligen chemischen Bindungen exakt zugeordnet werden. Zu den detektierbaren Verbindungen zählen unter anderem Scherschwingungen, symmetrische und asymmetrische Streckschwingungen, Rotationschwingungen, etc.

In dieser Arbeit wurden trockene Faserfragmente mit unterschiedlichen Beschichtungen in einem FT-IR-Spektrometer (InfraRed Bruker Tensor 37, Bruker Corporation) mit einem Germanium-ATR-Kristall im direkten Kontaktmodus untersucht. Alle Messungen wurden im Absorptionsmodus mit atmosphärischer Kompensation durchgeführt. Die Auflösung betrug  $4\text{ cm}^{-1}$  bei 100 Messungen pro Probe im Wellenzahlbereich von 4000 bis  $800\text{ cm}^{-1}$ . Alle Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt und bei der Auswertung zur besseren Vergleichbarkeit mit einem Grundlinienkorrekturschritt angepasst.

### **2.2.13 Kontaktwinkelmessung**

Als Kenngröße für die Oberflächenenergie eines Materials gegenüber eines Wassertropfens kann die Kontaktwinkelmessung verwendet werden. Durch die Analyse des Benetzungs- und Abperlverhaltens des Wassertropfens wird der Grad an Hydrophobizität durch die Form des abgelegten Tropfens definiert. Der Randwinkel des Tropfens wird dabei im Drei-Phasen-Punkt gemessen und als Maß für die Oberflächenspannung auf dem untersuchten

Material verwendet. In dieser Arbeit wurden für die Kontaktwinkelmessung Ausschnitte der beschichteten und unbeschichteten Proben aus PCL in ein Surftens universal (OEG GmbH) eingelegt und mit einem Tropfenvolumen von 0,5 µl Milli-Q H<sub>2</sub>O benetzt. Für jede Probe wurden 5 Messungen durchgeführt und im Anschluss die erzeugten Tropfengeometrien automatisiert per Software ausgewertet.

## **2.2.14 Zellkulturexperimente**

### **Lebend-/Tot-Färbung**

Für die Lebend-/Tot-Färbung wurden die U87-Reporterzellen für 24 Stunden in einer Dichte von 30 000 Zellen pro ml auf den elektrogesponnenen Vliesen kultiviert. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 21 °C mit  $2 \times 10^{-6}$  M Calcein AM (grüner Farbstoff; lebende Zellen) und  $2 \times 10^{-6}$  M Ethidium Homodimer I (roter Farbstoff; tote Zellen) in 1xPBS inkubiert. Die Proben wurden direkt nach der Inkubation im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

### **Adhäsionsverhalten**

Für die Untersuchungen des Adhäsions- und Proliferationsverhaltens mit vereinzelt PCL-Faserfragmenten in Lösung wurden Zellen der Zelllinie M-MSV-BALB/3T3 (European Collection of Authenticated Cell Cultures, ECACC, UK) und BJ-Fibroblasten (CRL-225, ATCC, USA) in Eagle's minimal essentielles Medium (EMEM) nach den Herstellerangaben vorkultiviert. Für die Kultivierung während der Experimente wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) verwendet und mit 10 % fetalem Bovinem Serum (FBS) und 1 % Glutamin versetzt, um das Zellwachstum zu unterstützen. Um die Gefahr einer bakteriellen Kontamination zu verringern, wurde 0,1 % Gentamicin zugegeben. Für alle Experimente wurden die Zellen bei 37 °C in einem CO<sub>2</sub> Inkubator bei 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> Anteil kultiviert.

Die Proben wurden bis zur Untersuchung im Fluoreszenz Mikroskop für 7 Tage kultiviert. Das Medium wurde an Tag 2 und Tag 5 gewechselt und zusätzliche Waschschrte mit PBS durchgeführt. An Tag 7 wurde eine Lebend-/Tot-Färbung durchgeführt. Dafür wurden die Proben erneut mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,2 ml Calcein AM versetzt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde die Färbelösung durch PBS ersetzt und die Proben in einem Leica DFC450 C (Leica Microsystems) Fluoreszenzmikroskop analysiert.

## **Proliferationstest**

Zur Untersuchung der Proliferation von Zellen auf Kollagen beschichteten Vliesen mit unterschiedlichem Grad an Ausrichtung und Fragmentierung der Fasern wurden Reporterzellen vom Lehrstuhl Biophysik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg zur Verfügung gestellt. Diese Reporterzellen wurden durch einen lentiviralen Transfervektor generiert und exprimieren das fluoreszierende tdTomato-Protein in der äußeren Zellmembran. Die Expressierung ist dabei abhängig von der Phase des Zellzyklus in dem sich die Zelle befindet und erlaubt eine Evaluierung der Morphologie und des Proliferationsverhaltens. Die modifizierten U87-Reporterzellen wurden in „minimal essential Medium“ (MEM) mit Zugabe von 10 % FCS, 1 % Penizillin 50 U ml<sup>-1</sup>, Streptomycin 50 µg ml<sup>-1</sup>, 1 % GlutaMAX und 1 % 100 mM Natriumpyruvat kultiviert.

## **Migrationstest**

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 20 000 Zellen pro ml im inneren eines Hohlzylinders aus PTFE mit Innendurchmesser von 5 mm auf der Oberfläche der elektrogesponnenen Vliese ausgesät. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Anteil wurde der Zylinder entfernt. Die Zellen wurden für weitere 96 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert bevor die immunzytochemische Färbung durchgeführt wurde.

## **Immunozytochemische Färbung**

Für die immunzytochemische Färbung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4 % PFA/Sucrose für 15 Minuten fixiert und anschließend für 30 Minuten mit 5 % Ziegen Serum und 0,1 % Triton-X100 geblockt. Danach wurden die Zellen für eine Stunde mit ActinGreen<sup>TM</sup> 488 ReadyProbes<sup>TM</sup> Reagenz in einer 1:50 Verdünnung mit 5 % NGS inkubiert. Nach drei Waschschrritten wurden die Zellen mit Mowiol fixiert.

## **Live-Cell-Imaging**

U87-Zellen wurden mit einer Dichte von 30 000 Zellen pro Well in 24-Well-Platten mit und ohne Kollagenbeschichtung ausgesät und mit reinem Medium oder 1 mg/ml Faseranteil inkubiert. Nach 2 Stunden Inkubation wurde die 24-Well-Platte im *zenCELL owl* Inkubator Mikroskop platziert und für 3 Tage analysiert. Dabei wurde von jedem Well alle 17 Minuten eine Aufnahme gemacht und die Zellzahl, die Fläche der Zellbesiedelung und die Anzahl der adhärenierten und nichtadhärenierten Zellen automatisiert ermittelt.

## **Konfokale Mikroskopie und Bildverarbeitung**

Für die Aufnahmen der immunzytochemischen Färbung wurde ein invertiertes Mikroskop, Modell Olympus iX81, mit Diodenlasern der Wellenlängen 405 nm, 473 nm und 559 nm verwendet. Alle dargestellten Aufnahmen wurden mit einem Olympus UPLSAPO 60x (Öl, numerische Apertur: 1,35) aufgenommen. Die Aufnahmen der Lebend-/Tot-Färbung wurden aufgenommen mit einem invertierten Mikroskop, Modell Olympus IX83.

Zur Auswertung der Lebend-/Tot-Färbung auf den Vliesen mit unterschiedlicher Beschichtung wurden Übersichtsaufnahmen mit 10x Vergrößerung verwendet. Die entstandenen Aufnahmen wurden mit Hilfe der Bildanalyse Software ImageJ automatisiert für beide Kanäle (grün/rot) verarbeitet. Dazu wurde auf jedes Bild ein Threshold zwischen 0 und 70 angewendet und die resultierenden Schwarz-Weiss Bilder mit der Funktion Analyze Particles (15-200 Pixel Units; 0,00-1,00 Circularity) ausgewertet. Für jede Messung wurden mindesten 100 Zellen unter Verwendung von mindestens fünf unterschiedlichen Aufnahmen gezählt.

# Kapitel 3

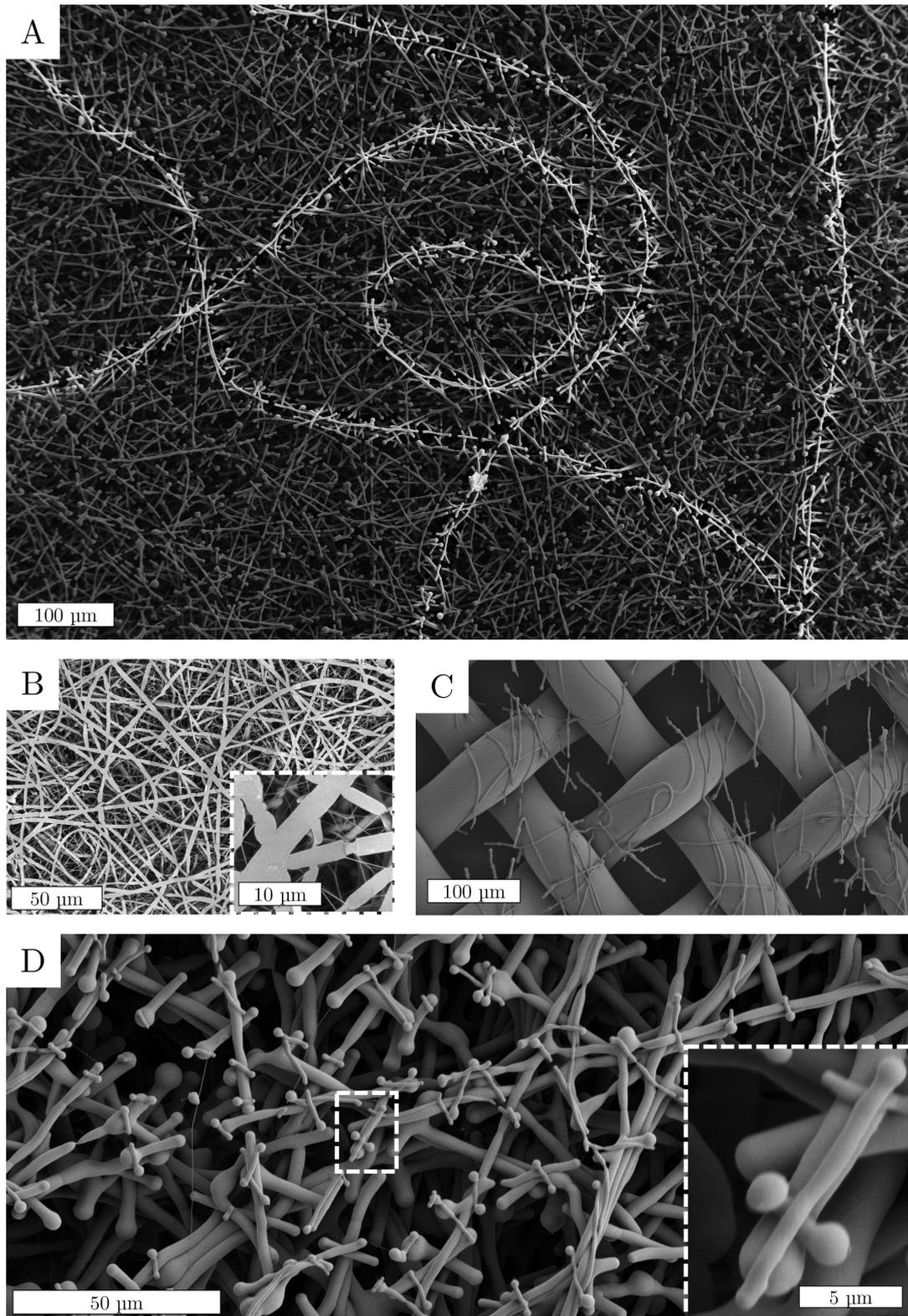
## Ergebnisse

### 3.1 Herstellung von Faserfragmenten in Hantelform aus Polycaprolacton

Vorversuche beim Elektrosplennen von PCL zeigen unregelmäßiges Auftreten fragmentierter Fasern direkt im Splennprozess. Um das Auftreten dieses Effekts im Prozessfenster der *in situ* Fragmentierung näher zu untersuchen, werden weitere Splennversuche mit PCL im HFIP durchgeführt, die zu folgenden Beobachtungen führen.

Wie die REM-Aufnahmen in Abbildung 3.1-A zeigen, liegen einzelne Fragmente axial zueinander ausgerichtet in Form einer durchgehenden Faser vor. Dies deutet auf eine nachträgliche Fragmentierung der Fasern nach der Ablagerung auf dem Kollektor hin. Untersuchungen der Unterseite des Vlieses, wie in Abbildung 3.1-B dargestellt, unterstützen diese Vermutung. Die ersten Schichten der abgelagerten Fasern sind immer zusammenhängend. Erst nach einer gewissen Zeit (und damit Schichtdicke) kommt es zur Fragmentierung.

Versuche mit Kollektoren, die mit einem Netz aus Polyamid 6.6 (Nylon) bespannt sind (Abb. 3.1-C), zeigen, dass damit bereits in der ersten Schicht der gesponnenen Fasern eine Fragmentierung induziert werden kann. Die entscheidende Größe ist nicht die Dicke der Schicht, sondern die Schaffung einer unebenen Oberflächenstruktur, auf der die Fasern platziert werden, was zu Bereichen mit frei hängenden Fasern führt. Durch Variation des Volumenstroms während des Splennprozesses (Abb. 3.1-D) können in einem kontinuierlichen Prozess Fragmente mit unterschiedlichen Durchmessern erzeugt werden. Damit kann gezeigt werden, dass die Morphologie der erzeugten Fragmente bis zu einem gewissen Grad gesteuert werden kann.

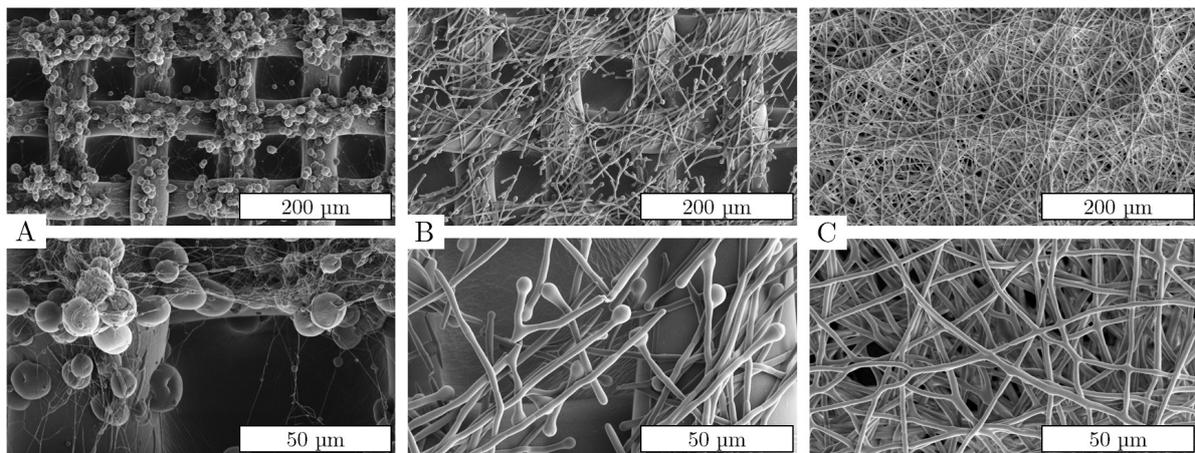


**Abbildung 3.1:** Repräsentative rasterelektronenmikroskopische Analysen von elektrogenesponnenen Vliesen aus PCL in HFIP. (A) Übersichtsaufnahme mit Einfärbung mehrerer abgelegter Fasern. (B) Unterseite eines gesponnenen Vlieses mit durchgängigen Fasern. (C) Netz aus PA 6.6 als Kollektor mit PCL-Fragmenten. (D) Erzeugung von Fragmenten in verschiedenen Größenordnungen im selben Prozess.

### 3.1.1 Einfluss der Polymerkonzentration und des Molekulargewichtes auf die Morphologie der Fragmente

Um den Zusammenhang zwischen der Morphologie und der Konzentration bzw. dem Molekulargewicht des verwendeten Polymers PCL näher zu untersuchen, werden mehrere Versuchsreihen durchgeführt.

Vorversuche mit 45 kDa PCL belegen in Abbildung 3.2, dass durch Variation der Konzentration im Bereich von 10 % w/v bis 30 % w/v drei verschiedene Morphologien erzeugt werden können. Bei 10 % w/v (Abb. 3.2-A) findet ein Elektrosprühen statt, bei dem ausschließlich kugelförmige Fragmente mit Durchmessern von  $10,1 \pm 2,2 \mu\text{m}$  erzeugt werden. Eine Erhöhung der Konzentration des PCL-Anteils in der Spinnlösung auf 30 % w/v (Abb. 3.2-C) führt zur Herstellung von Endlosfasern mit Faserdurchmessern von  $2,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$ . Aufgrund der hohen Viskosität dieser Lösungen treten hier erste Trocknungseffekte an der Kanüle auf, die immer wieder zu Unterbrechungen des Spinnprozesses führen. In einem engen Konzentrationsbereich bei  $20 \pm 2 \%$  w/v PCL in HFIP (Abb. 3.2-B) entstehen kontinuierlich und reproduzierbar hantelförmige Faserfragmente.



**Abbildung 3.2:** Elektrogesponnene Fasern und Faserfragmente aus unterschiedlich konzentrierten Spinnlösungen in der REM-Analyse. Bildung von (A) Kugeln bei einer Polymerkonzentration von 10 % w/v, (B) hantelförmigen Fragmenten bei 20 % w/v und (C) kontinuierlichen Fasern bei 30 % w/v.

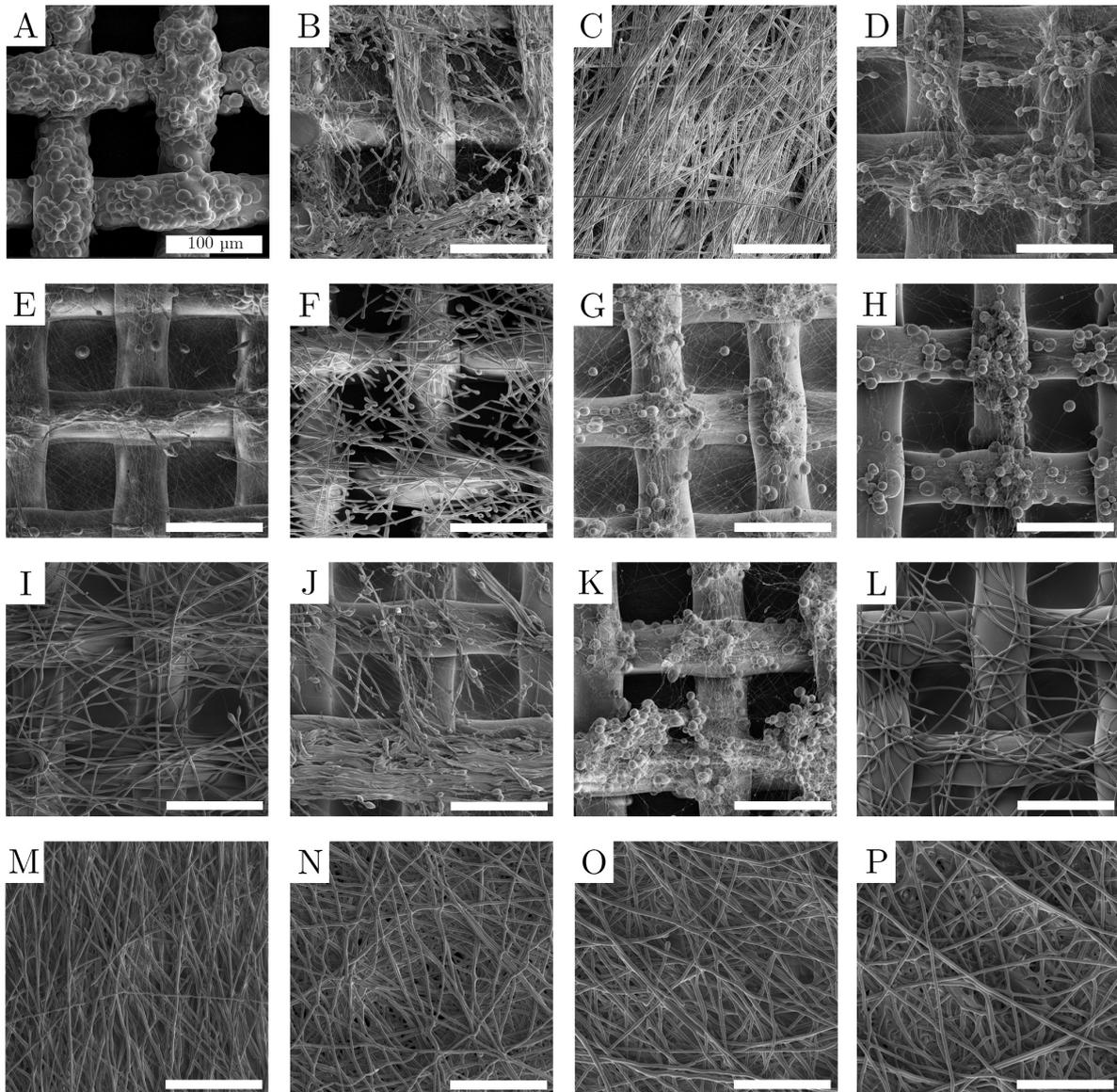
Ausgehend von diesen Versuchen wird die in Tabelle 3.1 aufgeführte Versuchsmatrix der Spinnlösungen in Abhängigkeit von Lösungskonzentration und Molekulargewichtsverhältnis untersucht. Dazu werden die Lösungen unter kontrollierten Bedingungen gemäß Abschnitt 2.2.1 versponnen, wobei die angelegte Spannung zu Beginn an das jeweilige Spinnverhalten der Lösung angepasst wird, um einen stabilen Taylorkonus zu gewährleisten.

Ergebnisse

Probe	MW PCL [mg/mL]			Konz. [% w/v]	Morphologie	Länge [µm]	Ø-Faser [µm]	Ø-Kugel [µm]	Aspekt- verhältnis
	10 kDa	45 kDa	80 kDa						
A	200	-	-	20	Kugel	-	-	11,13±3,13	1
B	-	200	-	20	Fragment	21,69±11,71	1,81±0,50	3,68±1,01	11,98±5,35
C	-	-	200	20	Faser	∞	2,75±0,42	-	∞
D	20	180	-	20	Kugel	-	-	8,12±1,73	1
E	50	180	-	23	Fragment	22,63±10,49	1,71±0,47	9,54±1,78	9,67±3,28
F	-	180	20	20	Fragment	42,80±22,69	2,34±0,38	4,83±0,87	18,29±4,29
G	50	120	-	17	Kugel	-	-	10,58±2,67	1
H	100	120	-	22	Kugel	-	-	12,04±3,27	1
I	-	120	50	17	Fragment	34,77±11,16	2,31±0,24	2,42±0,68	15,05±3,01
J	-	120	20	14	Fragment	13,89±9,27	1,34±0,45	3,31±0,94	10,37±2,27
K	100	100	-	20	Kugel	-	-	10,98±2,73	1
L	-	100	100	20	Faser	∞	2,90±0,49	-	∞
M	-	100	50	15	Fragment	58,34±29,71	2,24±0,36	3,19±0,95	26,04±12,96
N	100	-	100	20	Faser	∞	2,66±0,30	-	∞
O	120	-	80	20	Fragment	96,77±46,68	2,75±0,53	3,74±0,90	35,19±9,83
P	80	-	120	20	Faser	∞	3,53±0,34	-	∞

**Tabelle 3.1:** Versuchsmatrix zur Untersuchung des Zusammenhangs der Morphologie aus unterschiedlichen Molekulargewichten und Konzentrationen der PCL-Spinnlösung (n=100).

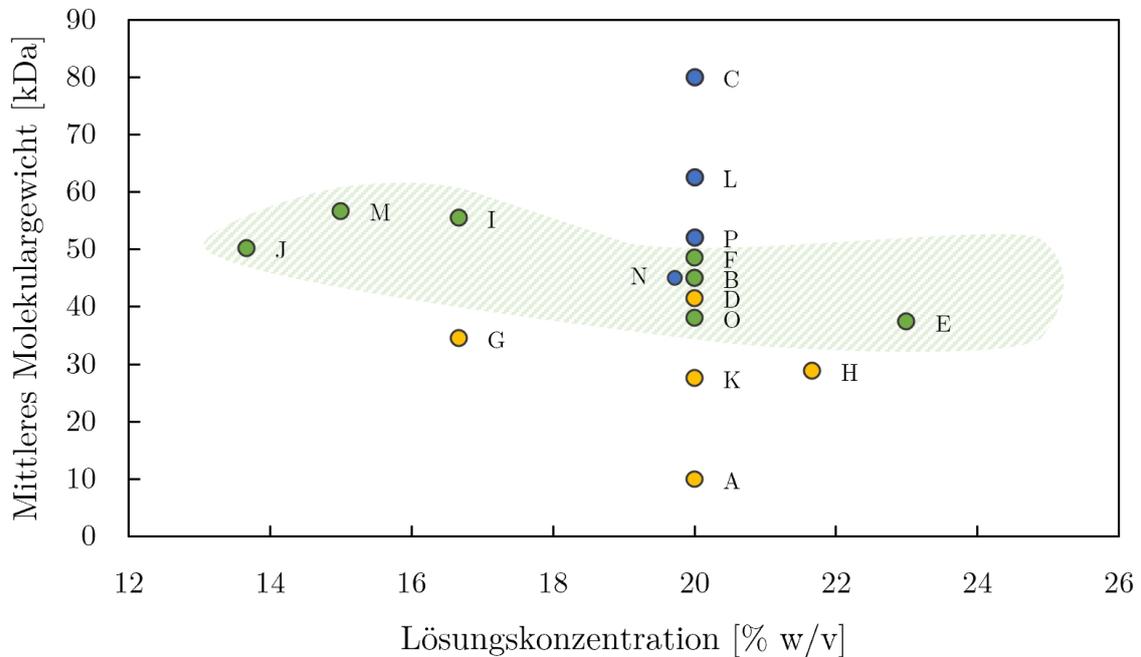
Die hergestellten Vliese werden mittels REM untersucht und hinsichtlich morphologischer Parameter ausgewertet. Eine Übersicht der hergestellten Proben ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Für die Auswertung werden die Proben zunächst in Kategorien eingeteilt: Kugeln, Fragmente und Fasern. Anschließend werden, wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, die Durchmesser der Fasern und Kugeln sowie die Länge der Fragmente gemessen und das durchschnittliche Aspektverhältnis berechnet. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Tabelle 3.1 dargestellt.



**Abbildung 3.3:** Ergebnisse der REM-Analysen der Proben nach Tabelle 3.1. Die eingezeichneten Messbalken entsprechen 100 µm.

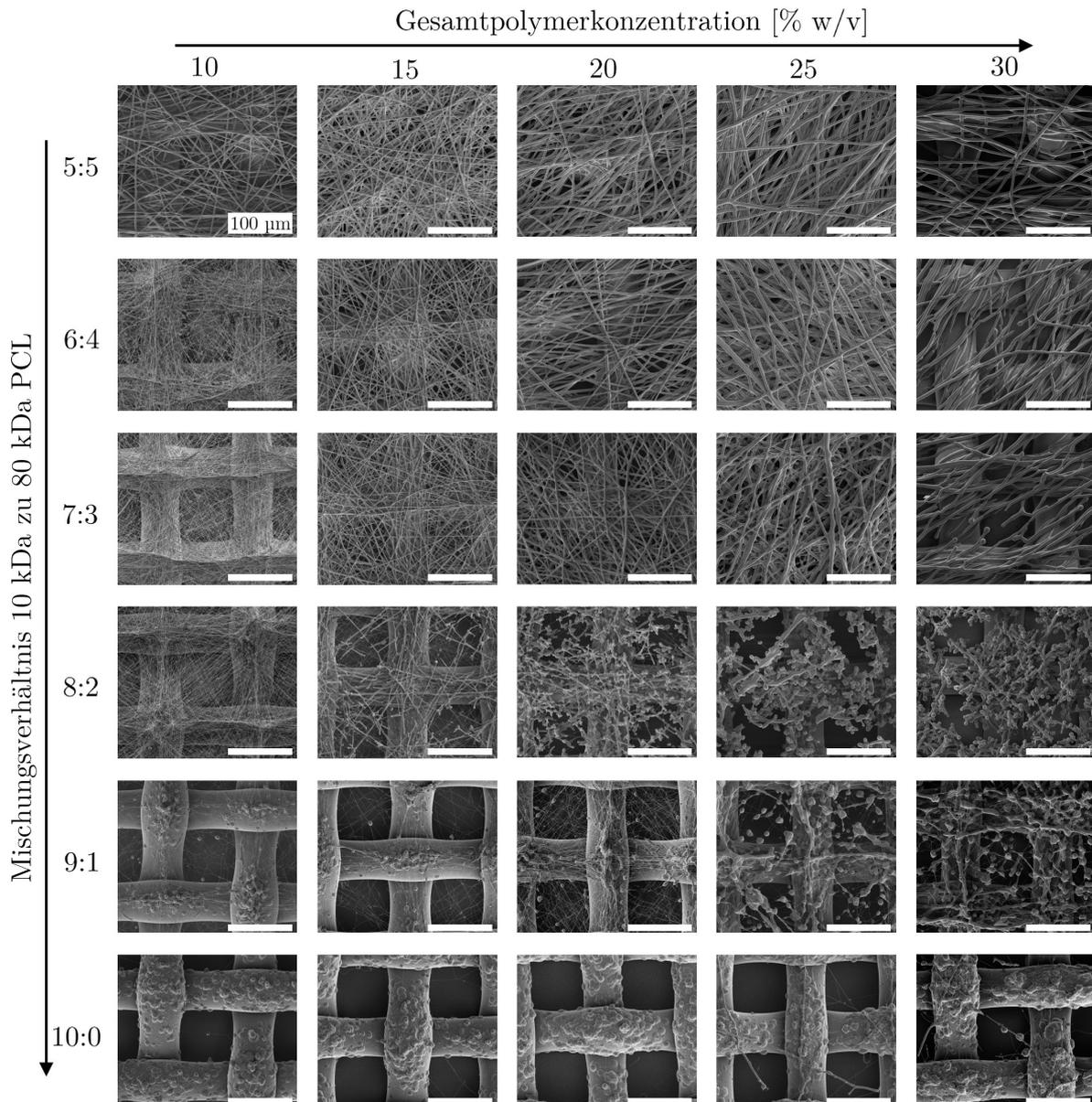
Die Proben B, E, F, I, J, M & O werden als fragmentbildend identifiziert, wobei die Probe O mit einem Aspektverhältnis von 35,19 den höchsten Wert aufweist (Tabelle 3.1). Das belegt, dass Mischungen unterschiedlicher Molekulargewichte zu einer Aufweitung

des Prozessfensters führen, innerhalb dessen Fragmente gebildet werden können (Abb. 3.4). Die höchsten Aspektverhältnisse werden in den Proben mit bimodaler Molekulargewichtsverteilung erreicht, besonders ausgeprägt bei der Mischung von 10 kDa und 80 kDa PCL.



**Abbildung 3.4:** Einordnung der untersuchten Proben nach ihrer Gesamtkonzentration und dem mittleren Molekulargewicht. Die Morphologien der Proben sind in Abhängigkeit der Konzentration und des Molekulargewichts dargestellt: Kugeln (gelb), Fragmente (grün) und Fasern (blau). Der schraffierte Bereich markiert das hier ermittelte Prozessfenster für die Herstellung von Fragmenten.

Da ein hohes Aspektverhältnis eine der vorgestellten Randbedingungen darstellt, werden aufbauend auf diesen Ergebnissen bimodale Mischungen aus 10 kDa und 80 kDa näher untersucht. Dabei wird der Konzentrationsbereich von 10 % bis 30 % mit jeweils sechs verschiedenen Mischungsverhältnissen untersucht. Eine Übersicht über die Ergebnisse der REM-Analyse ist in Abbildung 3.5 dargestellt.



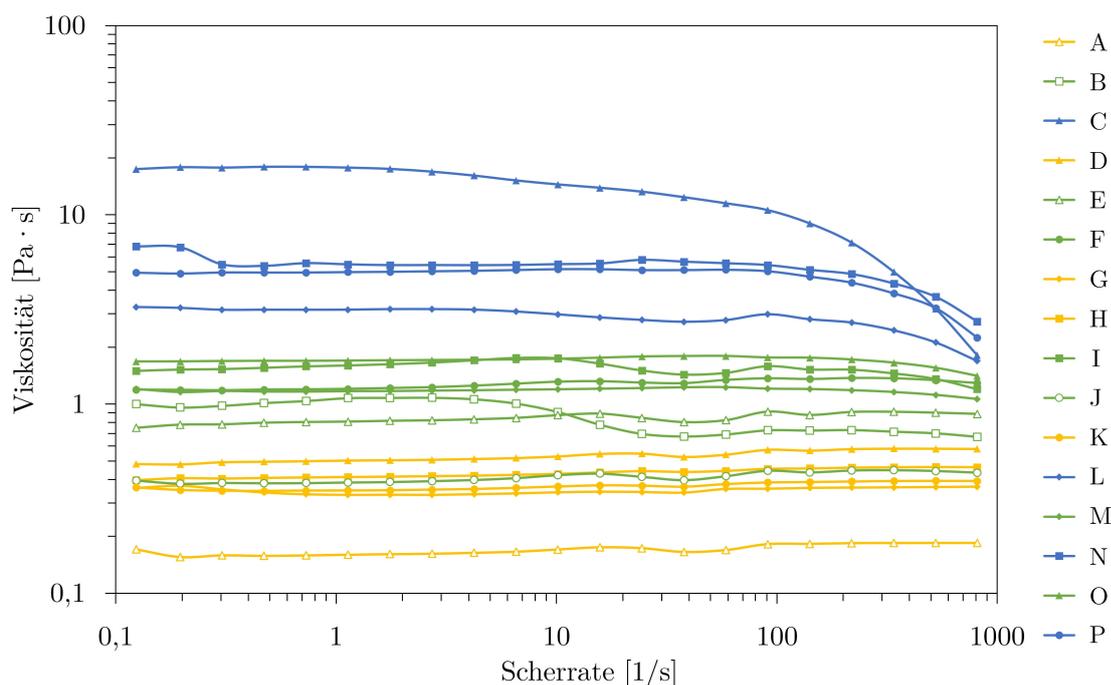
**Abbildung 3.5:** REM-Analyse der systematischen Untersuchung von bimodalen Mischungen aus 10 und 80 kDa PCL mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen im Konzentrationsbereich von 10 bis 30 % w/v. Die eingezeichneten Messbalken entsprechen 100  $\mu\text{m}$ .

In diesem Zusammenhang sind zwei Tendenzen deutlich zu erkennen. Zum einen lassen die REM-Aufnahmen in den horizontalen Zeilen den erwarteten Effekt erkennen, dass mit steigender Konzentration der Faserdurchmesser zunimmt. Eine Betrachtung der Aufnahmen innerhalb der einzelnen vertikalen Spalten zeigt, dass eine Verringerung des Faserdurchmessers und eine verstärkte Bildung von Kugeln bei einer Erhöhung des Mischungsverhältnisses zu Gunsten des 10 kDa PCL auftritt. Im Bereich der Mischungsverhältnisse 7:3 bis 9:1 und bei Konzentrationen größer 20 % bilden sich vermehrt Faserfragmente. Höhere Polymerkonzentrationen führen zu größeren Faserdurchmessern, Mischungsverhältnisse mit höheren 80 kDa PCL-Anteilen zu längeren Fragmenten. Da Konzentration und

Molekulargewicht entscheidend die Viskosität der Spinnlösung beeinflussen, wird dieser Zusammenhang im Folgenden untersucht.

### 3.1.2 Rheologische Untersuchung der Spinnlösungen

Neben den Auswertungen der REM-Analysen werden die eingesetzten Spinnlösungen in Rotationsversuchen, wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben, rheologisch untersucht und miteinander verglichen. Dabei zeigen sich für die beiden betrachteten Versuchsreihen in Abbildung 3.6 und Abbildung 3.7 vergleichbare Trends. Die Proben A bis O decken den Bereich von 0,2 Pa·s bis 20 Pa·s ab und zeigen überwiegend newtonsches Verhalten. Probe C weist ab Scherraten von 100 1/s ein stark scherverdünnendes Verhalten auf. Die farbliche Markierung der Proben in Abbildung 3.6 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen Probenmorphologie und Scherverhalten der Lösung. Die gelb gefärbten Graphen entsprechen den als Kugeln klassifizierten Proben, die grüne Färbung steht für Fragmente und die blaue Färbung für kontinuierliche Fasern.

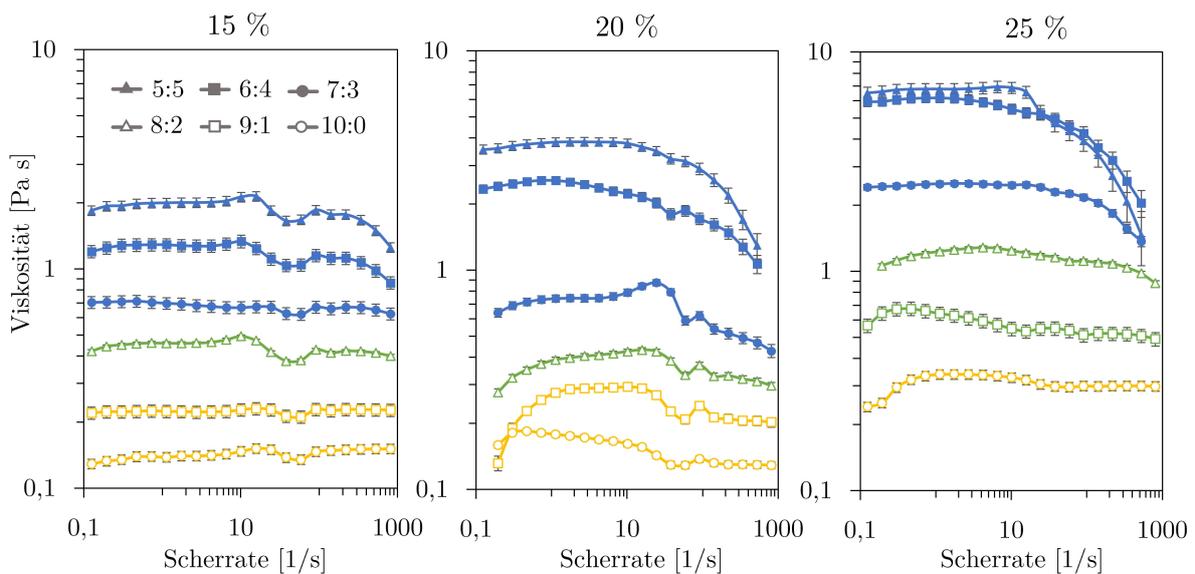


**Abbildung 3.6:** Vergleich der Viskosität von Spinnlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen und Molekulargewichten gemäß Tabelle 3.1 im Rotationsversuch. Zur besseren Übersicht sind repräsentative Kurven ohne Fehlerbalken dargestellt. Die Kurven sind entsprechend der Morphologie für Kugeln (gelb), Fragmente (grün) und Fasern (blau) eingefärbt.

Der hier erkennbare Trend verdeutlicht, dass die Proben mit der niedrigsten Viskosität (unter 0,7 Pa·s) zur Bildung von Kugeln führen, während die Proben mit einer Visko-

sität über 2 Pa·s zu kontinuierlichen Fasern führen. Im Bereich von 0,7 Pa·s bis 2 Pa·s können Fragmente identifiziert werden. Eine Ausnahme stellt hier die Probe J dar, die mit 14 % w/v die niedrigste Gesamtkonzentration der untersuchten Proben aufweist, aber durch den hohen Anteil an hochmolekularem 80 kDa PCL eine Viskosität von 0,4 Pa·s (und damit eine höhere Viskosität als andere Proben mit höherer Gesamtkonzentration) aufweist und trotzdem Fragmente bildet. Dieser Effekt wird noch deutlicher im Vergleich der bimodalen Mischungen mit 10 kDa und 80 kDa PCL.

Die Auswertung der rheologischen Untersuchungen der variablen bimodalen Mischungen für 15 % w/v, 20 % w/v und 25 % w/v ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Es sind ähnliche Trends wie zuvor zu erkennen, jedoch wird die Abgrenzung der Morphologie mit zunehmender Konzentration immer schwieriger. Proben bis zu einem Mischungsverhältnis von 7:3 (10 kDa:80 kDa PCL) zeigen ein nahezu newtonsches Verhalten, bei den Verhältnissen 5:5 und 6:4 ist bereits bei allen Konzentrationen ein scherverdünnendes Verhalten oberhalb von 20 1/s zu beobachten.



**Abbildung 3.7:** Vergleich der Viskositätsmessungen bei drei verschiedenen Konzentrationen (15 % w/v, 20 % w/v und 25 % w/v) und verschiedenen Mischungsverhältnissen von 10 kDa PCL zu 80 kDa PCL (5:5/6:4/7:3/8:2/9:1/10:0). Die Graphen wurden entsprechend der Morphologie für Kugeln (gelb), Fragmente (grün) und Fasern (blau) farblich markiert.

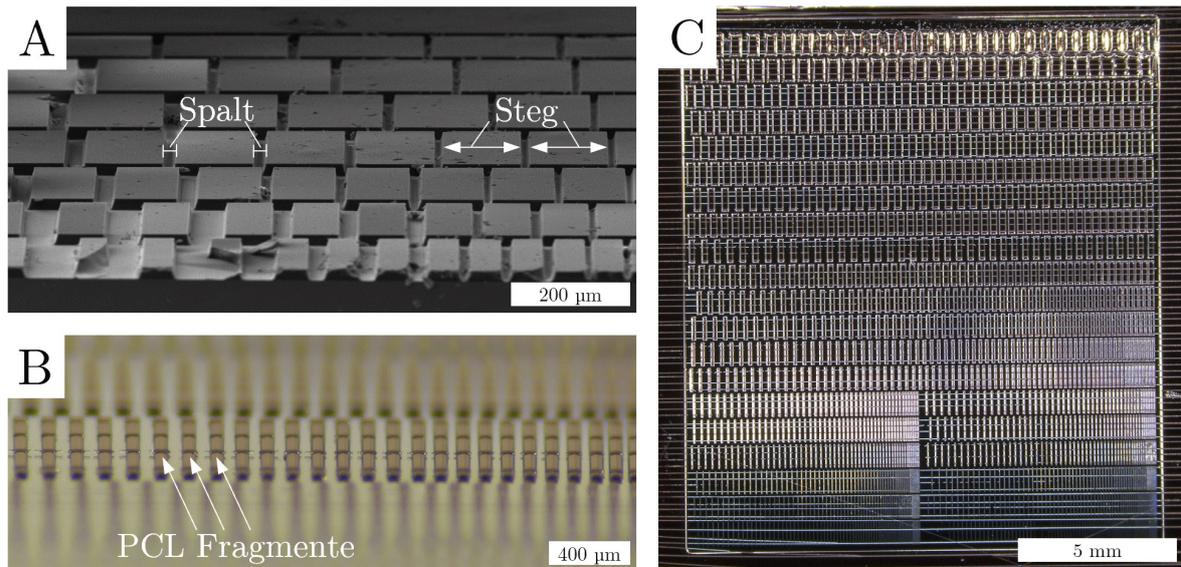
Der Übergang von 20 % w/v zu 25 % w/v PCL-Anteil in der Spinnlösung markiert zudem den Übergang zu einem erweiterten Prozessfenster. Hier können erstmals Fragmente bei zwei Mischungsverhältnissen reproduzierbar beobachtet werden. Dieser Trend ist auch in Abbildung 3.5 deutlich zu erkennen. Bei einer Gesamtkonzentration von 10 % w/v werden noch keine eindeutigen Fragmente erzeugt, während diese bei einer Konzentration von 30 % w/v in einem Mischungsbereich zwischen 7:3 und 9:1 klar nachweisbar sind.

Die untersuchten Spinnlösungen zeigen im Bereich niedriger Scherraten von 0,1 bis 10 1/s newtonsches Verhalten. Abhängig von der Gesamtkonzentration und der Mischung der Molekulargewichte wird ein Viskositätsbereich von 0,1 bis 20 Pa·s abgedeckt. Ab einer Viskosität von mehr als 1 Pa·s kann bei Scherraten über 100 1/s ein scherverdünnendes Verhalten beobachtet werden, das mit zunehmender Viskosität stärker ausgeprägt ist.

### 3.1.3 Vergleich zwischen Elektrosponnen aus Polymerlösung und elektrostatischem Schmelzspinnen

Das elektrostatische Schmelzspinnen, kurz MEW (*Melt Electro Writing*), erfährt seit seiner Vorstellung 2011 verstärktes wissenschaftliches Interesse.[115] Mit diesem Verfahren lassen sich sehr präzise, komplexe Strukturen aus Fasern im Mikro- bis Nanometerbereich herstellen. Damit stellt das MEW auch eine attraktive Plattformtechnologie für die Untersuchung der Faserfragmentierung dar. Ein unerwünschter Nebeneffekt bei der Herstellung von 3D-Strukturen mit mehreren Schichten ist das Abreißen der Faser im Bereich von Überhängen und die Bildung eines tropfenförmigen Endstücks.[124] Diese Geometrie weist Ähnlichkeiten mit dem hier bereits beschriebenen Verhalten von PCL-Fasern aus dem elektrostatischen Lösungssponnen auf. Dies wird im Folgenden zum Anlass genommen, diesen Effekt durch Variation der Prozessparameter Schmelze- und Umgebungstemperatur reproduzierbar herbeizuführen (Abbildung 3.8). Der Vorteil der Anwendung des MEW zur Herstellung von Faserfragmenten liegt in der Präzision dieser Methode und damit in der Möglichkeit, Fragmente mit nahezu monomodaler Längenverteilung herstellen zu können. Erfahrungen bei der Herstellung mehrlagiger Strukturen im MEW verdeutlichen, dass insbesondere die Umgebungs- und die Schmelzetemperatur einen Einfluss darauf haben, ob eine Faser einen Überhang kontinuierlich überspannen kann oder unter Spannung reißt. Zusätzlich zu diesen beiden Parametern wird mittels Photolithographie eine Substratplatte mit exakt definierter Oberflächenstruktur, dargestellt in Abbildung 3.8-A, hergestellt und direkt auf diese gedruckt.

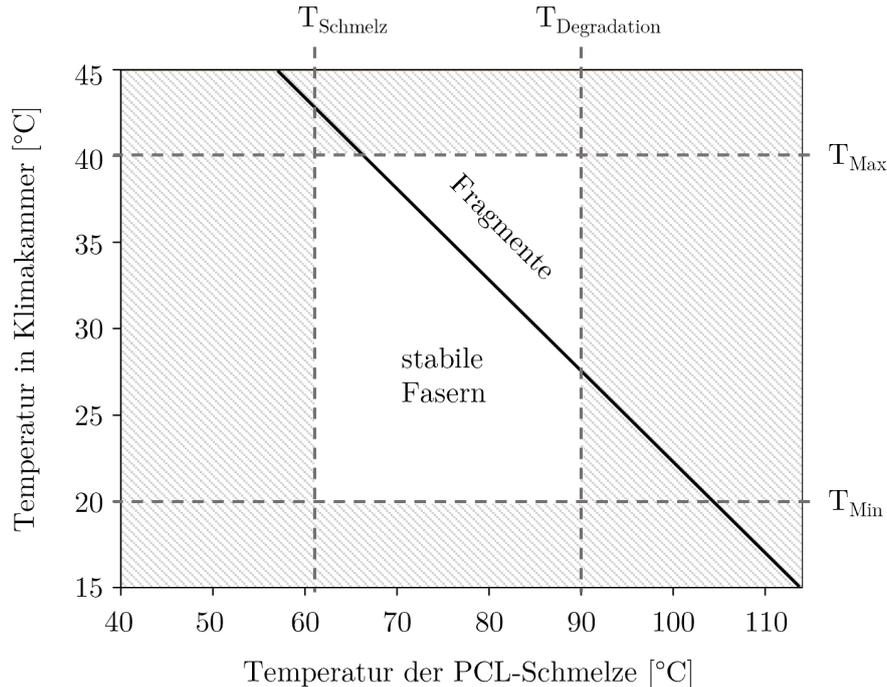
Die nach Abschnitt 2.2.4 erzeugte Oberfläche besteht aus quaderförmigen Erhebungen mit klar definierten Kanten und Zwischenräumen. Ziel der Gestaltung der Substratgeometrie ist es, durch kontinuierliche Variation der beiden Parameter Stegbreite und Stegabstand Grenzwerte zu ermitteln, bei denen der Fragmentierungseffekt in einem Experiment unter kontrollierten Bedingungen beobachtbar wird. Die Substratplättchen werden, wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, in einem MEW mit integrierter Klimakammer (Kontrolle von Umgebungstemperatur und Luftfeuchtigkeit) auf der Druckplatte fixiert und mit einer PCL-Schmelze (Purasorb PC 12, Corbion) beschrieben. Die erzeugte Geometrie wird anschließend im Lichtmikroskop (Abb. 3.8-B) und im REM (Abb. 3.10) analysiert.



**Abbildung 3.8:** Analysen des photolithographisch hergestellten Substrates im MEW. (A) REM-Analyse des unbenutzten Substrates mit Markierung der Stege und Zwischenräume. (B) Stereomikroskopische Aufnahme des beschichteten Substrates und Markierung der abgeschiedenen PCL-Fragmente. (C) Stereomikroskopische Übersichtsaufnahme des gesamten besponnenen Chips in der Draufsicht.

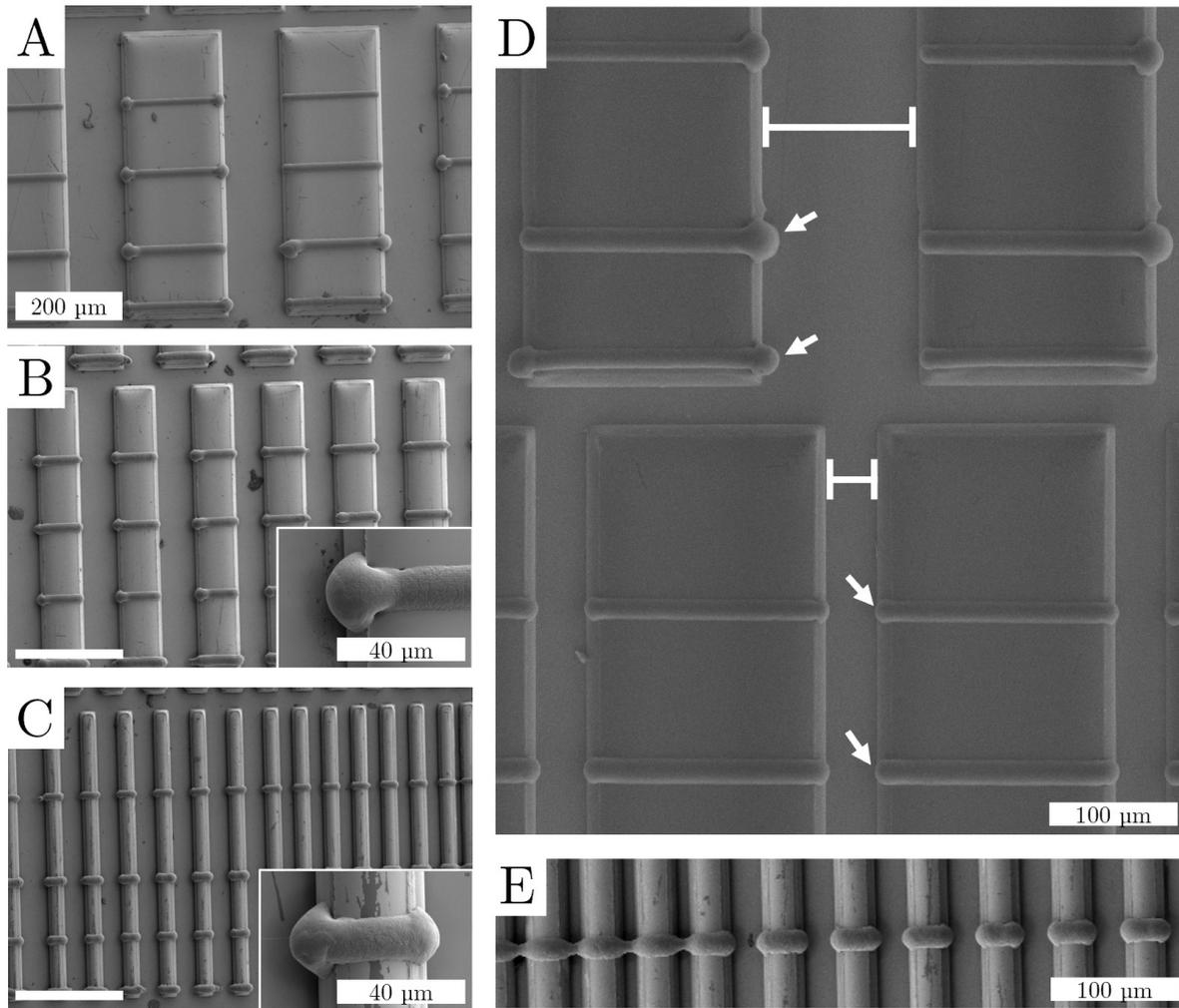
Bei der Ermittlung der geometrischen und temperaturabhängigen Grenzwerte für das Fragmentierungsverhalten im MEW werden folgende Beobachtungen gemacht: Maßgeblich für die Ausbildung von Fragmenten sind die Umgebungs- und die Schmelztemperatur wie in Abbildung 3.9 dargestellt. Für die Schmelztemperatur wird  $75\text{ °C}$  als untere Grenze ermittelt, bei der noch Fragmente entstehen. Durch Variation der Umgebungstemperatur kann gezeigt werden, dass Temperaturen über  $31\text{ °C}$  zu einer verstärkten Fragmentierung führen. Oberhalb dieser Grenzen wird der Anteil der Fragmente durch ein Zusammenspiel der beiden Temperaturen bestimmt.

Im entsprechenden prognostizierten Prozessierungsfenster muss eine der beiden Temperaturen erhöht werden, wenn die andere konstant gehalten wird, um den Fragmentanteil zu steigern. Da die Schmelztemperatur nur in einem gewissen Rahmen erhöht werden kann bevor Degradationseffekte im PCL auftreten (bereits ab  $90\text{ °C}$ ), ist eine Erhöhung der Umgebungstemperatur in den meisten Fällen vorteilhafter. [125] Klare Zusammenhänge mit der Variation der Luftfeuchtigkeit konnten hier nicht erkannt werden, so dass die Analyse der temperaturinduzierten Effekte im Vordergrund steht.



**Abbildung 3.9:** Erwartetes Verarbeitungsfenster von PCL in der Klimakammer aufgrund von Materialparametern und Gerätespezifikationen nach Vorversuchen. Markiert sind die Schmelztemperatur von PCL bei 63 °C und der Beginn nachweisbarer Degradation nach Paxton et al. bei 90 °C.[126] Die Klimakammer kann im Bereich von 20 °C bis 40 °C stabil betrieben werden.

Die Beispielaufnahmen in den Abbildungen 3.10 A-C zeigen die Bandbreite der reproduzierbar herstellbaren Fragmente mit exakt einstellbaren Längen von 40  $\mu\text{m}$  bis 200  $\mu\text{m}$ . Die Länge der Fragmente korreliert direkt mit der Stegbreite. Die Morphologie der Enden der einzelnen Fragmente hängt stark vom Abstand der gedruckten Stege ab. Als untere Grenze für den Abstand der Stege zueinander wurde 20  $\mu\text{m}$  ermittelt. Darunter bleiben die Fasern miteinander verschmolzen und es findet keine vollständige Auftrennung in Fragmente statt (Abb. 3.10-E). Oberhalb dieser Grenze hat der Stegabstand keinen Einfluss mehr auf den Anteil der entstehenden Fragmente, wohl aber auf die Morphologie der Fragmente. Bei kleinen Stegabständen treten vermehrt stäbchenförmige Faserfragmente ohne deutliche Verdickung an den Enden auf, während mit zunehmendem Stegabstand der Durchmesser der Kugeln an den Fragmentenden zunimmt. In den mittleren, auf den Stegen abgelagerten Bereichen weisen die Fragmente stets homogene Durchmesser im Bereich von  $17 \pm 3 \mu\text{m}$  auf. Abbildung 3.8-D zeigt die Bildung von durchgehend zylindrischen Faserfragmenten mit geringen Abständen im unteren Bildbereich im Gegensatz zur deutlich ausgeprägten Hantelform mit kugelförmig verdickten Enden im oberen Bildbereich.



**Abbildung 3.10:** REM-Analyse der auf dem Substrat abgelagerten Fasern mit den Stegbreiten (A) 200 µm, (B) 100 µm und (C) 40 µm. Der Stegabstand (D) beeinflusst die Durchmesser der Kugelenden, wobei ein minimaler Abstand (E) für die Fragmentierung von 20 µm ermittelt wurde.

Die vorgestellten Verarbeitungsmethoden des elektrostatischen Lösungsspinnens und des Schmelz-Elektro-Schreibverfahrens stellen somit zwei Verfahren dar, um unter kontrollierten Bedingungen Faserfragmente unterschiedlicher Größe aus PCL herzustellen. Im Folgenden wird der Einfluss von elektrogesponnenen hantelförmigen Faserfragmenten auf die Rheologie von faserverstärkten Komposit-Hydrogelen näher untersucht.

## **3.2 Einfluss der PCL-Faserfragmente auf Hydrogele**

Da die vorgestellten Faserfragmente als mechanische Verstärkung in Biotinten eingesetzt werden sollen, steht nachfolgend der Einfluss der Fragmente auf die Rheologie und Druckeigenschaften von faserverstärkten Hydrogelen im Vordergrund. Dafür werden elektrogewebene, unbeschichtete PCL-Faserfragmente mit einem Durchmesser von  $2,75 \pm 0,53 \mu\text{m}$  und einer durchschnittlichen Länge von  $96,77 \pm 46,88 \mu\text{m}$  verwendet.

### **3.2.1 Einfluss der PCL-Faserfragmente auf die Morphologie von Hydrogelen im getrockneten Zustand**

Im Weiteren werden die mittels elektrostatischem Spinnen gewonnenen Fragmente in den Konzentrationen 2 % w/v, 5 % w/v und 10 % w/v in drei unterschiedliche Hydrogele gemischt, um den Einfluss der PCL-Fragmente auf die Gelstruktur im Vergleich zu unverstärkten Hydrogelen zu untersuchen. Die untersuchten Hydrogele sind 20 % Pluronic, 3 % Alginate und ein 3 %iges Gel aus dem rekombinant produzierten Spinnenseidenprotein eADF4(C16).

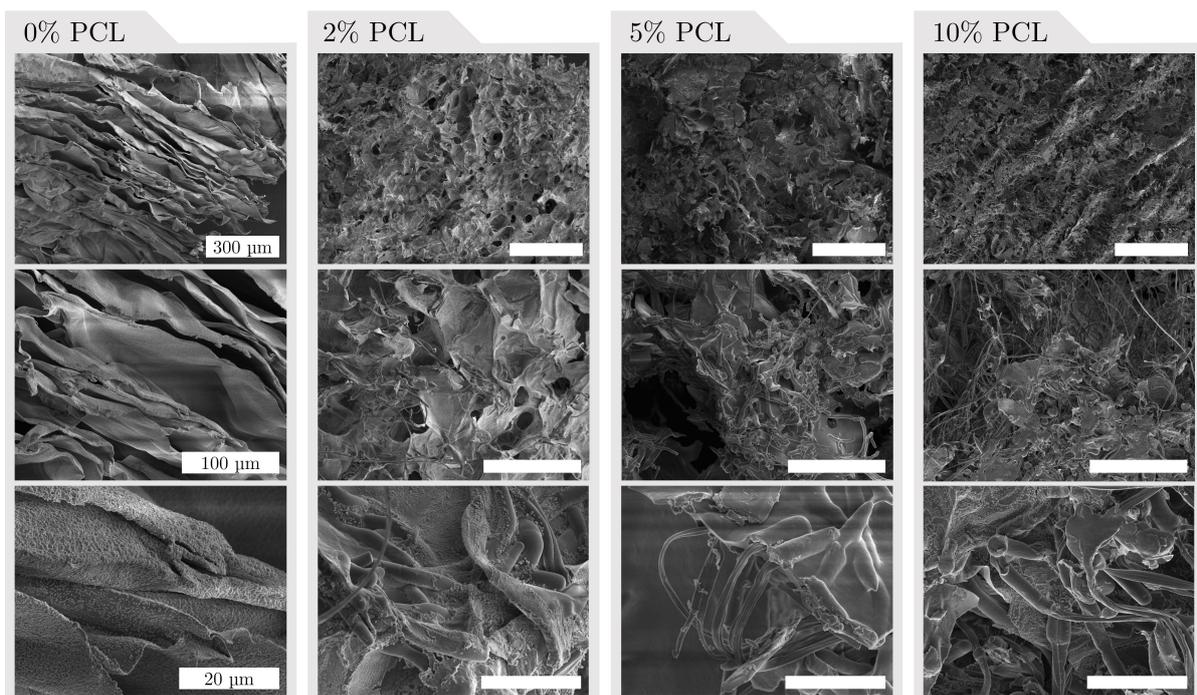
Diese drei Gele werden ausgewählt, um repräsentativ drei unterschiedliche Materialklassen der Biotintenentwicklung abzudecken. Hydrogele auf Basis von Blockcopolymeren wie Pluronic werden bereits vielseitig eingesetzt, da sie sowohl ausgezeichnete Druckeigenschaften wie auch eine hohe Formstabilität nach dem Druck aufweisen.[127, 128] Jedoch sind für diese Eigenschaften hohe Feststoffkonzentrationen an Polymer im Hydrogel ab 25 % notwendig, was zu einer geringen Beweglichkeit der verdrukten Zellen führt. Durch den Einsatz der Faserfragmente soll es ermöglicht werden, den Polymeranteil zu verringern, und gleichzeitig gute Formstabilität gewährleistet werden.

Hydrogele auf Basis von Alginate zählen zu den am häufigsten verwendeten Hydrogelen in der Biofabrikation.[74] Es wird als wässrige Lösung verdrukt und zur Stabilisierung in einem Fällbad ionisch nachvernetzt. Die Faserverstärkung soll dazu dienen die Formstabilität nach dem Druck bis zur vollständigen Vernetzung zu garantieren.

Zusätzlich wird ein Hydrogel aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) hergestellt. Durch die rekombinante Herstellung des Proteins können beliebige Modifikationen vorgenommen werden, um das Gel beispielsweise für eine spezifische Zellart zu funktionalisieren.[129] Die physikalischen Interaktionen, die zur Stabilisierung des Gels beitragen, sind allerdings nicht stark genug, um eine dauerhafte Festigkeit dreidimensionaler Konstrukte zu gewährleisten. Daher soll hier die Faserverstärkung zur Stabilisierung während und nach dem Druckprozess beitragen.

Alle Proben werden nach der vollständigen Gelierung nach Abschnitt 2.2.11 getrocknet, geschnitten und für die REM-Analyse präpariert. Eine Übersicht der verschiedenen Proben in jeweils drei Vergrößerungen kann den Abbildungen 3.11, 3.12 und 3.13 entnommen werden. Für die Auswertung der Porendurchmesser (Abb. 3.14) werden die REM-Analysen nach Abschnitt 2.2.11 mittels der Bildanalyse Software ImageJ vermessen.

Bei den Proben aus Alginat (Abb. 3.11) ist ohne Faseranteil eine kompakte schichtartige Struktur erkennbar, wobei die einzelnen Schichten geschlossene Oberflächen und Dicken im Bereich weniger Mikrometer aufweisen. Durch Zugabe der PCL-Fragmente ändert sich die Struktur erkennbar zu einem schwammartigen offenporigen System. Eine Erhöhung der Konzentration an Fragmenten von 2% w/v auf 10% w/v führt zu einer schrittweisen Reduzierung der Porendurchmesser von  $61,5 \pm 24,6 \mu\text{m}$  auf  $36,0 \pm 6,1 \mu\text{m}$  (Abb. 3.14). Dabei entsteht mit zunehmender Faserkonzentration ein immer feinporigeres Netzwerk, welches von Fasern durchzogen ist. Eine nähere Betrachtung der Bruchkanten zeigt die homogene Integration der Fasern in die getrocknete Gelstruktur ohne erkennbare Phasenseparation oder auffällige Aggregation der Fragmente.

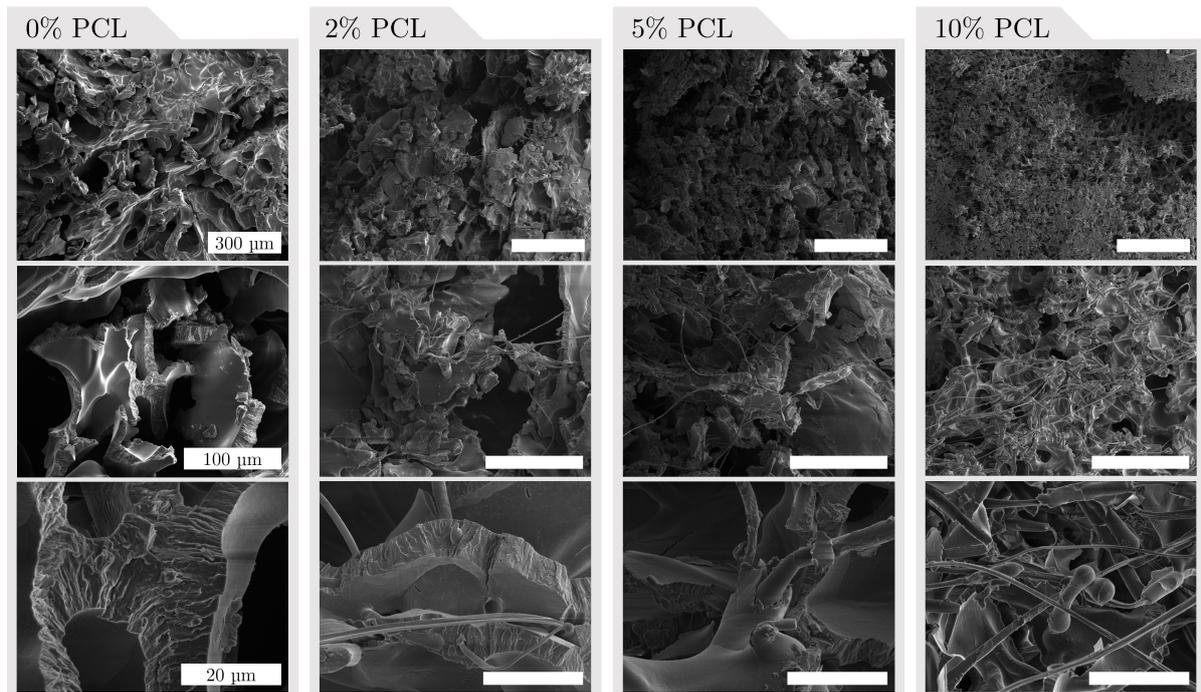


**Abbildung 3.11:** REM-Analyse der Hydrogelbruchkanten mit 3% Alginat. Repräsentative Aufnahmen der Proben in unterschiedlicher Vergrößerung bei steigendem Füllgrad an PCL-Faserfragmenten von 0% w/v auf 10% w/v.

Ein ähnliches Verhalten der Reduktion des Porendurchmessers kann auch bei den Hydrogelen aus Pluronic und eADF4(C16) beobachtet werden. Die Proben aus Pluronic (Abb. 3.12) zeigen dabei ohne Faserzusatz ein großporiges Netzwerk mit einer durchschnittlichen

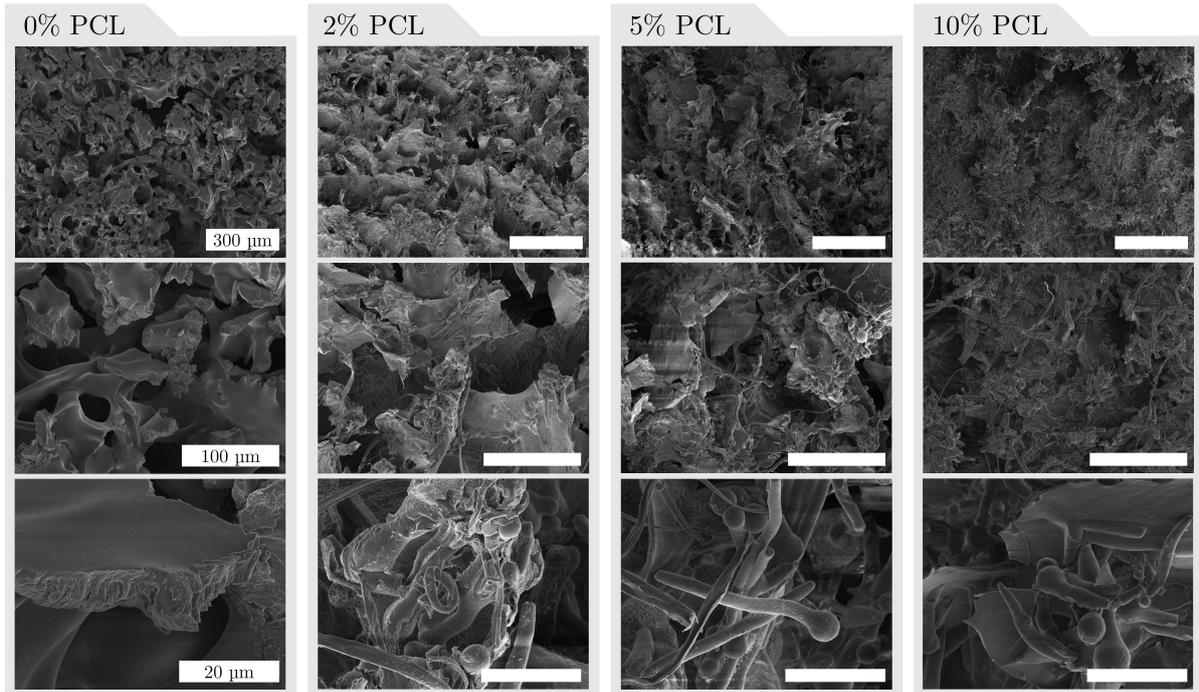
Porengröße von  $131,7 \pm 49,4 \mu\text{m}$ , ausgebildet von kompakten Trägerstrukturen.

Durch Erhöhung des Faseranteils reduziert sich die Porengröße auf  $30,2 \pm 11,6 \mu\text{m}$  bei 10 % w/v PCL-Anteil, wie in Abbildung 3.14 dargestellt. Zusätzlich nimmt die Wandstärke der tragenden Struktur deutlich ab. Im unverstärkten Hydrogel liegt die Wandstärke bei  $9,1 \pm 4,6 \mu\text{m}$ , sinkt nach Zugabe der Faserfragmente auf  $8,9 \pm 3,2 \mu\text{m}$  bei 2 % w/v,  $3,9 \pm 1,1 \mu\text{m}$  bei 5 % w/v und bis auf  $2,7 \pm 1,4 \mu\text{m}$  bei 10 % w/v Faseranteil. Die Detailaufnahmen zeigen in allen Proben eine gute Integration der Fragmente in die Matrix.



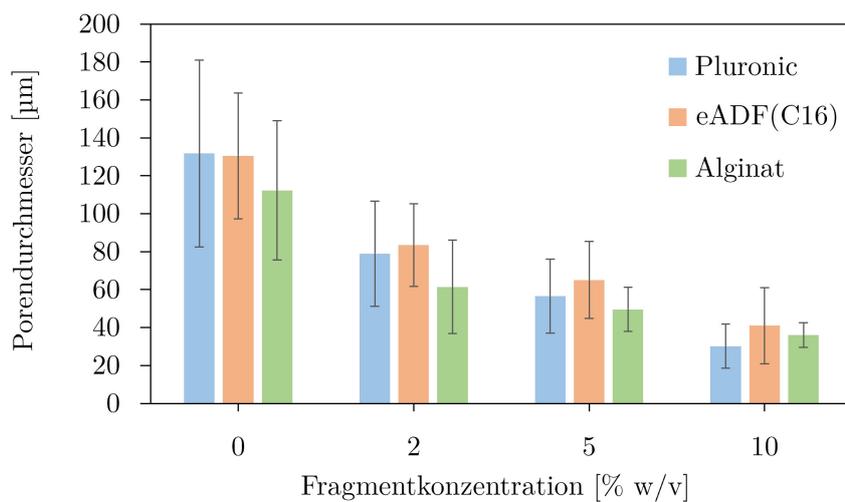
**Abbildung 3.12:** REM-Analyse der Hydrogelbruchkanten aus 20 % Pluronic. Repräsentative Aufnahmen der Proben in unterschiedlicher Vergrößerung bei steigendem Füllgrad an PCL-Faserfragmenten von 0 % w/v auf 10 % w/v.

Die getrockneten Hydrogele aus eADF4(C16) (Abb. 3.13) zeigen sehr ähnliche Trends in der Entwicklung des Porendurchmessers bei Steigerung des Faseranteils im Gel wie die bereits betrachteten Gele aus Pluronic. Die ermittelte Porengröße im unverstärkten Hydrogel liegt bei  $130,5 \pm 33,1 \mu\text{m}$  und sinkt durch Zugabe der Fragmente um 36 %, 50 % und 69 % auf  $41,0 \pm 20,1 \mu\text{m}$  bei 10 % w/v Faseranteil (Abb. 3.14). Die Betrachtung der Dicke der Wandstärke weist einen sprunghaften Abfall von ursprünglich  $9,8 \pm 4,4 \mu\text{m}$  im unverstärkten eADF4(C16) auf Werte im Submikro-Bereich auf. In den Proben mit 10 % w/v PCL-Faseranteil zeigt die Gelmatrix eine blattartige Struktur mit eingebetteten Fasern, welche an den Bruchkanten aus der Struktur herausragen. In den übrigen Bereichen sind die Faserfragmente jeweils komplett in die Matrix eingebettet.



**Abbildung 3.13:** REM-Analyse der Hydrogelbruchkanten aus 3% eADF4(C16). Repräsentative Aufnahmen der Proben in unterschiedlicher Vergrößerung bei steigendem Füllgrad an PCL-Faserfragmenten von 0% w/v auf 10% w/v.

Eine Auswertung der Entwicklung der Porendurchmesser mit steigender Fragmentkonzentration über alle drei untersuchten Hydrogelsysteme ist in Abb. 3.14 dargestellt, wobei die Tendenz deutlich eine Verringerung des Porendurchmessers bei steigender Fragmentkonzentration zeigt.



**Abbildung 3.14:** Abhängigkeit der Porendurchmesser von der Konzentration der PCL-Faserfragmente (Durchmesser:  $2,75 \pm 0,53 \mu\text{m}$ ; durchschnittliche Länge:  $96,77 \pm 46,88 \mu\text{m}$ ) in Hydrogelen aus Alginate, Pluronic und eADF4(C16) ( $n=30$ ).

Neben dem Einfluss der Faserfragmente auf die Morphologie der Hydrogele im getrockneten Zustand, ist die Untersuchung des Fließverhaltens ein weiterer wichtiger Indikator für die Anwendung als Füllstoff.

### **3.2.2 Einfluss der PCL-Faserfragmente auf die Rheologie von Hydrogelen aus Alginat, Pluronic und eADF4(C16)**

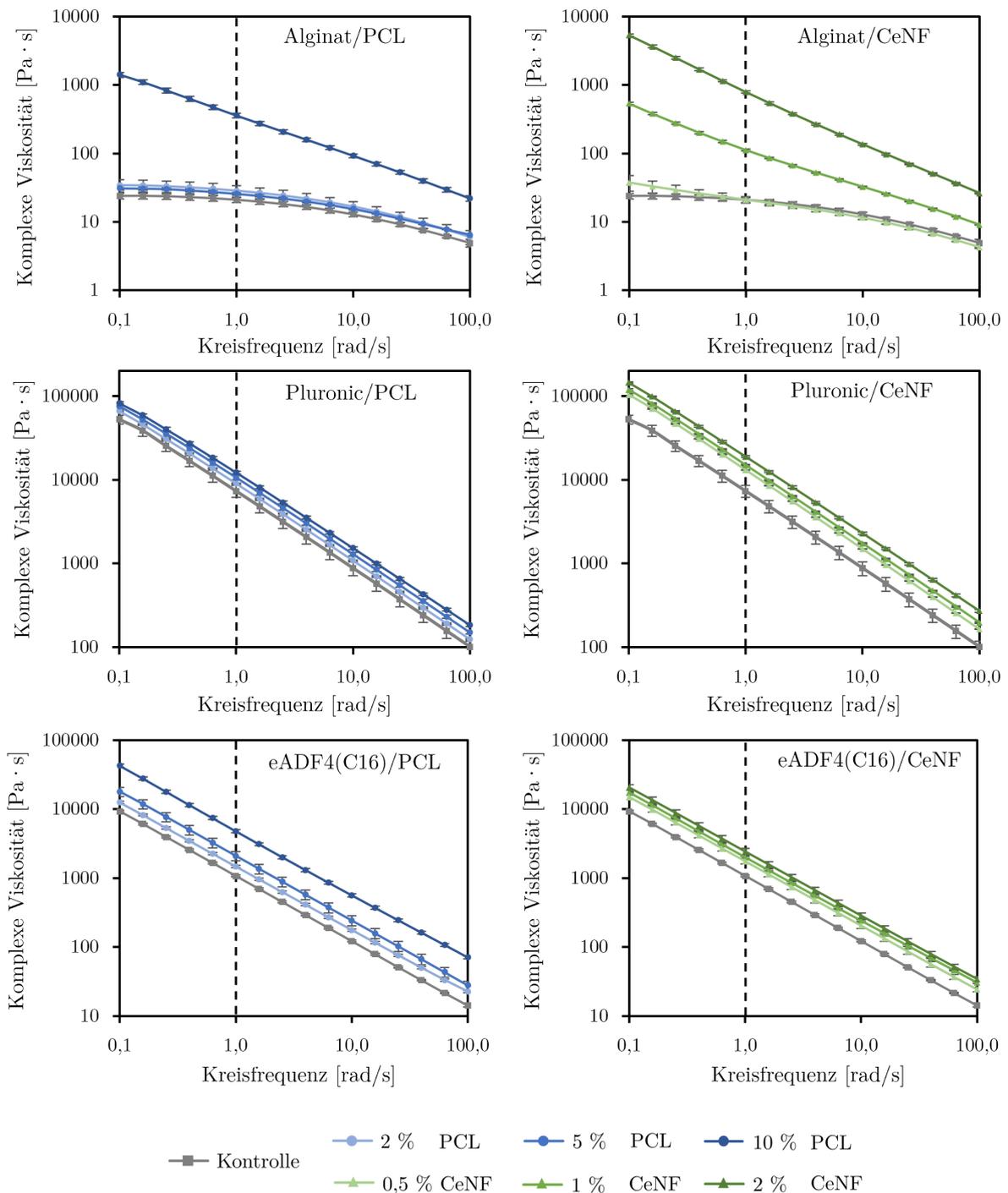
Um den Einfluss von Fragmenten auf das Fließverhalten und die Formstabilität von Hydrogelen im 3D-Extrusionsdruck zu untersuchen, wurden Gele aus 20 % Pluronic, 3 % Alginat und 3 % eADF4(C16) jeweils mit Cellulose-Nanofasern (CeNF) und PCL-Mikrofasern versetzt. CeNF werden dabei als gut dokumentiertes Vergleichsmaterial mit stark unterschiedlicher Morphologie zu den hergestellten PCL-Fasern verwendet, um dem systematischen Ansatz dieser Untersuchungen Rechnung zu tragen. Dabei werden nach Vorversuchen für ein vergleichbares Materialverhalten die Konzentrationen 0,5 % w/v, 1 % w/v und 2 % w/v für die Zugabe von CeNF und 2 % w/v, 5 % w/v und 10 %,w/v für die PCL-Fragmente festgelegt. Die resultierenden Faser-Gel-Kombinationen werden in einem mehrstufigen Protokoll rheologisch untersucht (wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben). Zusätzlich werden die Gele aus Pluronic und Alginat in einer modifizierten 3D-Druckvorrichtung gemäß Abschnitt 2.2.10 verdrückt und die zeitabhängige Änderung der Strangbreite nach dem Druck bestimmt.

#### **Fließverhalten im oszillatorischen Frequenztest**

Im ersten Schritt wird ein Frequenztest im Bereich von 0,1 rad/s bis 100 rad/s durchgeführt, wobei Erfahrungswerte aus Vorversuchen (Amplitudentest) sicherstellen, dass die verwendete Amplitude im linear-viskoelastischen Bereich des jeweiligen Hydrogels liegt. Die Ergebnisse der getesteten Gel-Faser-Kombinationen sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Das eingangs beschriebene erwünschte scherverdünnende Verhalten der Hydrogele für den Extrusionsdruck wird bereits im Frequenztest deutlich.

Die komplexen Viskositätskurven von reinem Alginat und Alginat mit niedrigem Füllgrad (0,5 % w/v CeNF, 2 % w/v PCL und 5 % w/v PCL) zeigen zu Beginn einen Plateaubereich, der erst ab etwa 1 rad/s in ein scherverdünnendes Verhalten übergeht. Dieses Verhalten kann in guter Näherung mit dem Carreau-Yasuda-Modell beschrieben werden, wie in Tabelle 3.2 dargestellt. Bei Zugabe des Faseranteils ist bei allen Proben ein Anstieg der Nullviskosität und der Unendlichviskosität sowie ein deutlicher Abfall des Power-Law-Index zu beobachten. Bei der Relaxationszeit kann kein eindeutiger Trend festgestellt werden, da diese bei Zugabe von 0,5 % w/v CeNF zwar stark von 1,6 s auf 43,4 s ansteigt,

bei PCL jedoch zunächst abfällt (0,8 s bei 2% w/v PCL) und dann deutlich schwächer ansteigt als bei CeNF (2,9 s bei 5% w/v PCL).



**Abbildung 3.15:** Komplexe Viskosität in Abhängigkeit der Kreisfrequenz im oszillatorischen Frequenztest für die Hydrogele Alginat 3%, Pluronic 20% und eADF4(C16) 3% mit einer Markierung bei 1 rad/s. Untersuchte Füllgrade an Faserverstärkung 2% w/v, 5% w/v und 10% w/v PCL-Fragmente und 0,5% w/v, 1% w/v und 2% w/v CeNF mit unverstärkten Hydrogelen als Kontrolle.

Anteil	Null-Viskosität [Pa · s]	Unendlich-Viskosität [Pa · s]	Relaxationszeit [s]	Yasuda-Hochzahl	Power-Law-Index
0 %	20±2	-79±19	1,6±0,3	14,1±8,8	0,963±0,007
0,5 % CeNF	53±14	-13±7	43,4±25	21,9±7,1	0,830±0,058
2 % PCL	38±8	-4±8	0,8±0,3	0,62±0,09	0,337±0,039
5 % PCL	34±2	-27±42	2,9±1,4	3,07±0,35	0,450±0,035

**Tabelle 3.2:** Modellparameter nach Carreau-Yasuda für die Proben mit Alginat.

Oberhalb eines kritischen Füllgrades (1 % w/v CeNF, 2 % w/v CeNF und 10 % w/v PCL) wird das Verhalten besser durch das Potenzgesetz beschrieben (Tabelle 3.3), eine Tendenz, die bei hohen Scherraten auch in Rotationsversuchen nachgewiesen werden kann. Für alle untersuchten Proben lag das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  über 0,97 und zeigt damit eine gute Übereinstimmung zwischen Modell und Messwerten. Die Zugabe der Fasersysteme zu Alginat führt sowohl bei CeNF als auch bei PCL zu einer Erhöhung des Fließkoeffizienten, wobei die Werte für CeNF durchweg über den Werten für PCL liegen. Der Power-Law-Index  $p$ , der eine allgemeine Aussage über das Fließverhalten erlaubt ( $p = 1$  Newton;  $p < 1$  scherverdünnend;  $p > 1$  scherverdickend), sinkt durch die Zugabe der Fasern deutlich unter 1. Während der Power-Law-Index bei PCL nach einem ersten Abfall von 0,96 auf 0,34 bei 5 % w/v mit zunehmender Faserkonzentration ansteigt, ist bei CeNF kein konsistenter Trend zu erkennen.

Anteil CeNF	Fließkoeffizient [Pa · s]	Power-Law-Index	Anteil PCL	Fließkoeffizient [Pa · s]	Power-Law-Index
0 %	20±2	0,963±0,007	0%	20±2	0,963±0,007
0,5 %*	53±14	0,830±0,058	2 %*	38±8	0,337±0,039
1 %	122±4	0,573±0,004	5 %*	34±2	0,450±0,035
2 %	696±191	0,748±0,029	10 %	324±31	0,603±0,009

**Tabelle 3.3:** Power-Law-Parameter der untersuchten Proben mit Alginat. Die mit \* markierten Werte entsprechen der Nullviskosität und dem Power-Law-Index aus der Carreau-Yasuda-Modellierung und werden hier vergleichend aufgeführt.

Im Gegensatz dazu zeigen alle Pluronic-Proben in der doppellogarithmischen Darstellung einen linearen Abfall (nach dem Potenzgesetz) der komplexen Viskosität um mehrere Größenordnungen mit den Power-Law-Parametern aus Tabelle 3.4. Für reines Pluronic

reduziert sich die komplexe Viskosität von ca. 50 kPa·s bei 0,1 rad/s auf 0,1 kPa·s bei 100 rad/s annähernd um den Faktor 500. Das lineare Verhalten der Graphen ist im gesamten Bereich der untersuchten Winkelgeschwindigkeiten konstant. Durch die Zugabe der Fasern in unterschiedlichen Füllgraden findet lediglich eine Verschiebung der komplexen Viskositäten statt, wobei eine Steigerung des Faserfüllgrades in allen Fällen auch eine Erhöhung der Viskosität zur Folge hat. Dies wird deutlich bei der Betrachtung des Fließkoeffizienten, der in beiden Fasersystemen kontinuierlich mit zunehmender Faserkonzentration ansteigt. Dieser Anstieg ist bei Zugabe von CeNF jedoch deutlich schneller als bei PCL. Der Power-Law-Index verändert sich durch Zugabe von CeNF kaum. Bei PCL ist ein leichter Trend zu fallenden Werten mit steigender Faserkonzentration erkennbar.

Anteil CeNF	Fließkoeffizient [Pa · s]	Power-Law-Index	Anteil PCL	Fließkoeffizient [Pa · s]	Power-Law-Index
0 %	7144±1125	0,916±0,009	0%	7144±1125	0,916±0,009
0,5 %	12209±776	0,926±0,014	2 %	8761±109	0,913±0,003
1 %	14725±237	0,930±0,003	5 %	10215±640	0,904±0,006
2 %	18545±515	0,912±0,003	10 %	11725±473	0,891±0,004

**Tabelle 3.4:** Power-Law-Parameter der untersuchten Proben mit Pluronic.

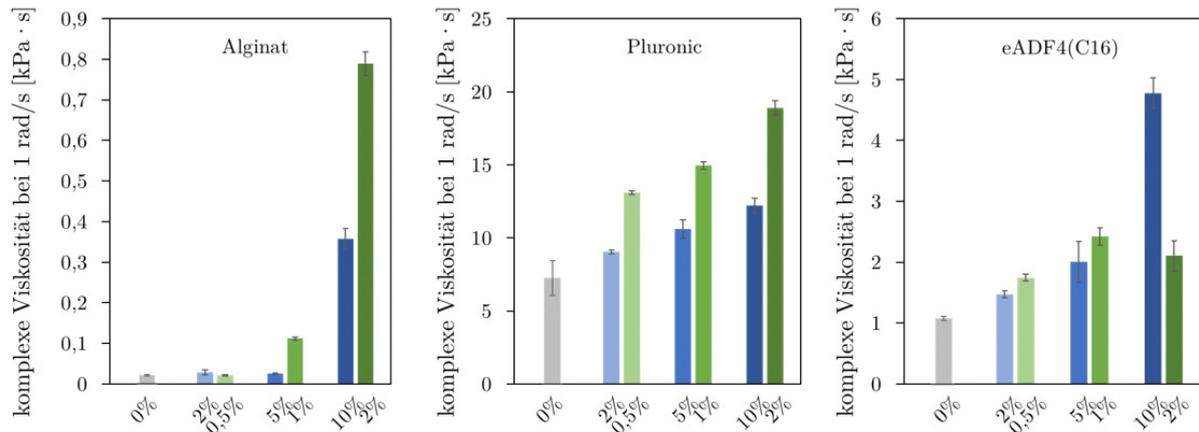
Ein Vergleich der Power-Law-Parameter der untersuchten Hydrogele aus eADF4(C16) in Tabelle 3.5 zeigt ein ähnliches Verhalten wie bei Pluronic. Insgesamt sind die Werte des Fließkoeffizienten deutlich geringer als bei Pluronic, jedoch führt auch hier eine Zugabe von Fasern zu einer Erhöhung um den Faktor 1,7 bis 2,4. Bei maximaler Faserkonzentration werden jedoch durch den Zusatz von PCL höhere Fließkoeffizienten erreicht als mit CeNF. Der Power-Law-Index ändert sich in beiden Fällen nur unwesentlich.

Anteil CeNF	Fließkoeffizient [Pa · s]	Power-Law-Index	Anteil PCL	Fließkoeffizient [Pa · s]	Power-Law-Index
0 %	1061±99	0,936±0,008	0%	1061±99	0,936±0,008
0,5 %	1746±53	0,931±0,004	2 %	1482±55	0,918±0,001
1 %	2424±143	0,929±0,002	5 %	2037±333	0,919±0,002
2 %	2099±243	0,936±0,004	10 %	4860±255	0,927±0,003

**Tabelle 3.5:** Power-Law-Parameter der untersuchten Proben mit eADF4(C16).

Ein Vergleich der komplexen Viskosität bei 1 rad/s in Abbildung 3.16 gibt weiteren Aufschluss über das Verhalten der Hydrogele bei Faserverstärkung. Im Fall von Alginat führen

niedrige Füllgrade (0,5 % w/v CeNF, 2 % w/v PCL und 5 % w/v PCL) nicht zu einem Anstieg der komplexen Viskosität. Erst bei höheren Füllgraden kann die Viskosität deutlich gesteigert werden, so dass beim höchsten Füllgrad der Ausgangswert von 21 Pa·s um den Faktor 10 bis 20 überschritten wird. Auch hier ist ein stärkerer Einfluss von CeNF auf die komplexe Viskosität zu beobachten.



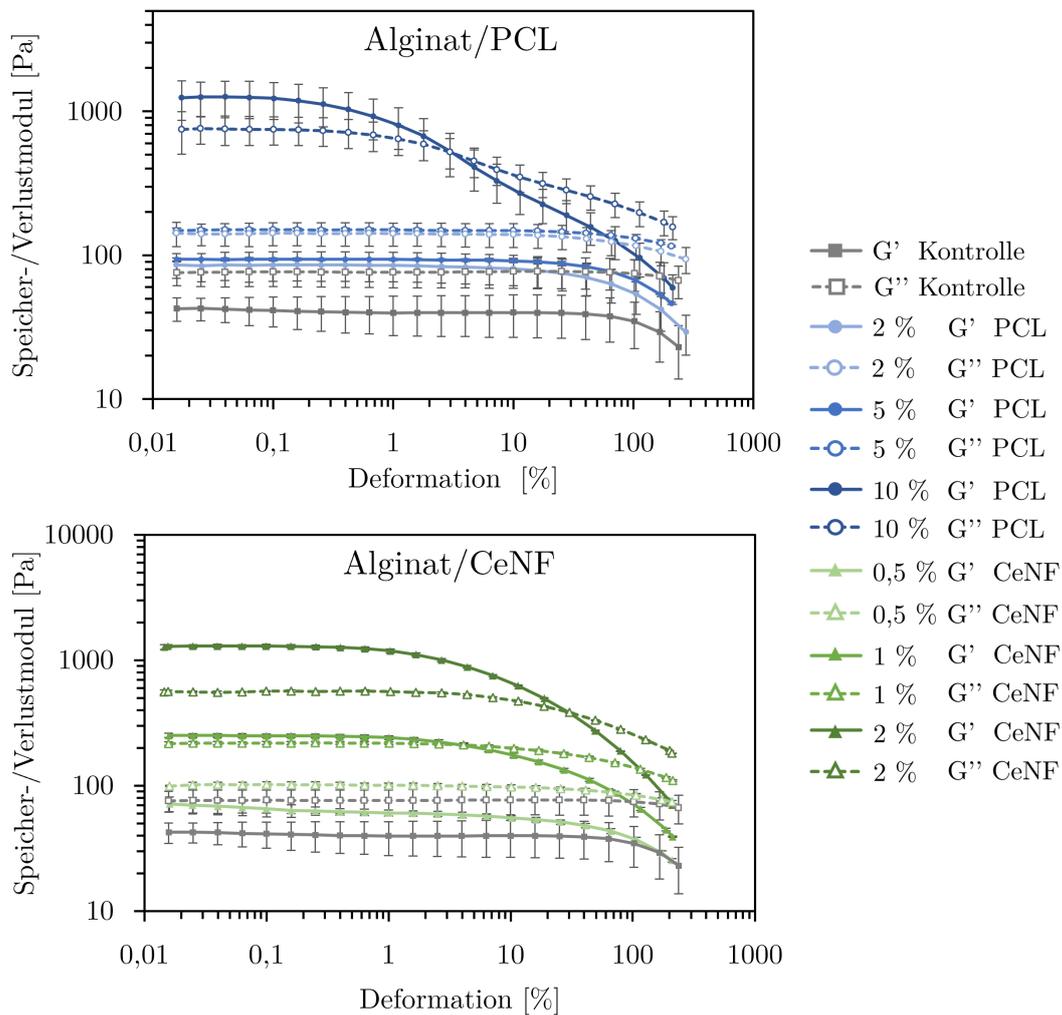
**Abbildung 3.16:** Komplexe Viskosität bei einer Kreisfrequenz von 1 rad/s im oszillatorischen Frequenztest für die Hydrogele Alginat 3%, Pluronic 20% und eADF4(C16) 3%. Unterschiedliche Füllgrade an CeNF (grüne Balken) und PCL (blaue Balken) im Vergleich.

Im Fall von Pluronic führt die Zugabe von Fasern zu einem linearen Anstieg der komplexen Viskosität von 7,3 kPa·s auf 12,2 kPa·s bei PCL und 18,9 kPa·s bei CeNF. Auffällig ist, dass bereits der geringste Füllgrad von CeNF zu einer höheren komplexen Viskosität (13,0 kPa·s) führt als die maximale Konzentration von PCL. Dies zeigt einen stärkeren Einfluss von CeNF auf das Verhalten der komplexen Viskosität von Pluronic im Vergleich zu den PCL-Fragmenten.

Ein ähnliches Verhalten kann bei den Gelen von eADF4(C16) beobachtet werden. Bereits die Zugabe von 5 % w/v PCL führt zu einer Verdoppelung der komplexen Viskosität von 1000 Pa·s im unverstärkten Gel auf 2000 Pa·s. Die Verdopplung der Faserkonzentration auf 10 % w/v PCL erhöht diesen Wert zusätzlich um den Faktor 2,5. Im Vergleich dazu führt die Zugabe von CeNF in diesem Gel zu einer maximalen komplexen Viskosität von 2400 Pa·s bei 2 % w/v CeNF im betrachteten Messbereich. Im systematischen Vergleich zwischen niedrigem, mittlerem und hohem Füllgrad hat PCL somit einen stärkeren Einfluss auf die komplexe Viskosität des Komposits. Bei Betrachtung der absoluten Faserkonzentration zeigen die CeNF eine höhere Effektivität bei der Erhöhung der komplexen Viskosität, da hier bereits mit 2 % w/v Fasereinsatz eine Erhöhung um den Faktor 2,5 erreicht werden kann.

### Fließverhalten im oszillatorischen Amplitudentest

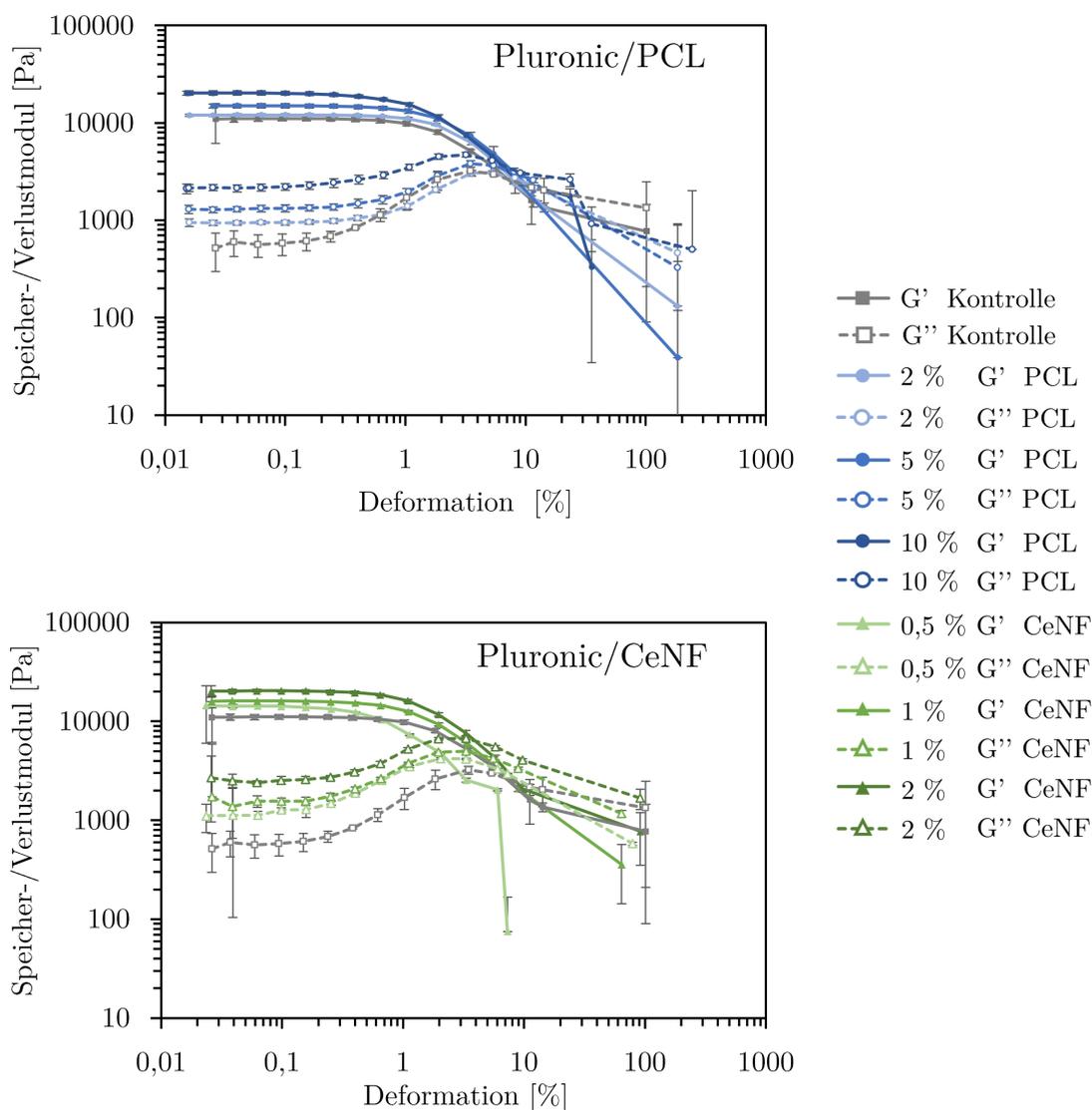
Die Auswertung der Amplitudentests (Abbildungen 3.17, 3.18 und 3.19) zeigt für die untersuchten Systeme ebenfalls ein scherverdünnendes Verhalten, wobei die Plateauwerte des Speichermoduls um mehrere Größenordnungen auseinander liegen. Für kleine Amplituden (unter 1 % Deformation) ergeben sich Werte für den Speichermodul von Pluronic über 10 kPa und von eADF4(C16) bei 1 kPa, während reines Alginat Werte um 40 Pa erreicht. Durch Zusatz von 10 % w/v PCL oder 2 % w/v CeNF kann der Speichermodul von Alginat auf über 1 kPa erhöht werden.



**Abbildung 3.17:** Speicher- und Verlustmodul in Abhängigkeit der Deformation im oszillatorischen Amplitudentest von unverstärktem 3 % Alginat (Kontrolle) und faserverstärktem Hydrogel mit 2 % w/v, 5 % w/v und 10 % w/v PCL-Fragmenten und 0,5 % w/v, 1 % w/v und 2 % w/v CeNF.

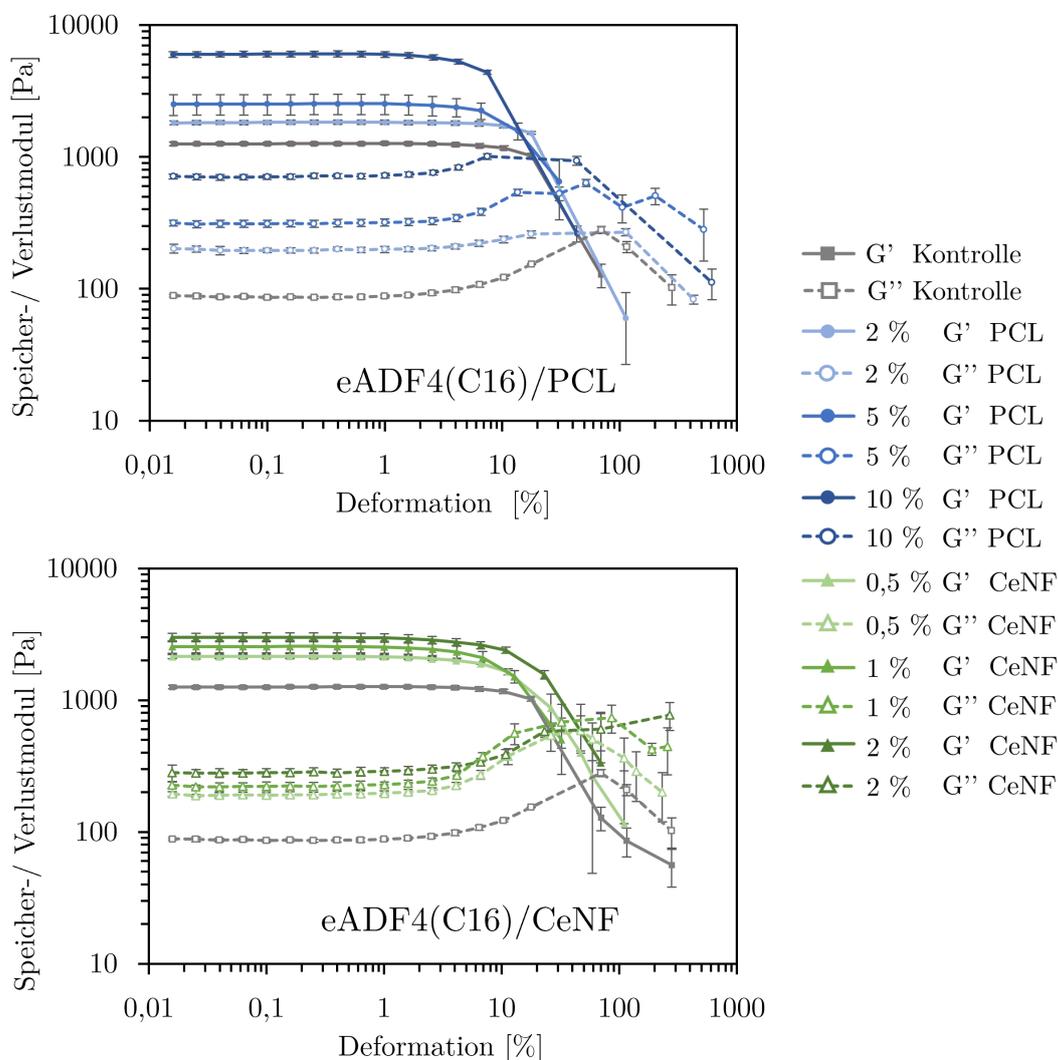
Die Zugabe von Fasern führt bei allen Proben zu einer Erhöhung des Speichermoduls. Ohne Faseranteil liegt der Verlustmodul des Alginats über dem Speichermodul, in die-

sem Zustand dominieren also die Eigenschaften einer Flüssigkeit. Der Zusatz von 2 % w/v und 5 % w/v PCL sowie 0,5 % w/v CeNF erhöht die Absolutwerte des Speichermoduls, der Verlustmodul überwiegt weiterhin. Erst bei 1 % w/v CeNF tritt der Grenzfall ein, bei dem der Speichermodul bei geringen Verformungen unter 3 % über dem Verlustmodul liegt. Bei maximalem Faseranteil ist sowohl bei PCL als auch bei CeNF Festkörperverhalten zu beobachten. Hier liegen die Speichermoduln in beiden Fällen über 1 kPa und damit deutlich über dem Verlustmodul. Die PCL-Fasern führen jedoch zu einem deutlich früheren Erreichen des Sol-Gel-Punktes, bereits bei 3 % Deformation, während dieser bei CeNF erst bei 30 % Deformation erlangt wird.



**Abbildung 3.18:** Speicher- und Verlustmodul in Abhängigkeit der Deformation im oszillatorischen Amplitudentest von unverstärktem 20 % Pluronic (Kontrolle) und faserverstärktem Hydrogel mit 2 % w/v, 5 % w/v und 10 % w/v PCL-Fragmenten und 0,5 % w/v, 1 % w/v und 2 % w/v CeNF.

Der Graph des Speichermoduls von Pluronic, aufgetragen gegen die Deformation, weist scherverdünnendes Verhalten auf. Bei geringer Deformation ist ein ausgeprägter linear-viskoelastischen Bereich (LVE-Bereich) erkennbar, mit einem deutlichen Abfall des Speichermoduls bei Überschreiten der kritischen Amplitude. Eine Erhöhung des Füllgrades steigert den Speichermodul im LVE-Bereich von  $1,1 \pm 0,7$  kPa im reinen Hydrogel auf  $2,0 \pm 1,0$  kPa bei 10 % w/v PCL-Faseranteil, bzw. auf  $2,0 \pm 0,7$  kPa bei 2 % w/v CeNF, was einer Erhöhung von ca. 80 % entspricht. Ein Vergleich mit den gleichen Füllgraden bei Alginate zeigt eine Erhöhung des Speichermoduls von  $40 \pm 13$  Pa auf  $1,2 \pm 0,3$  kPa für PCL und  $1,3 \pm 0,04$  kPa für CeNF. Für beide Fasersysteme entspricht dies einer Erhöhung um  $\sim 3000$  %. Damit wird gezeigt, dass durch die Zugabe von morphologisch und chemisch unterschiedlichen Fasern aus PCL und Cellulose ähnliche Werte für den Speichermodul im LVE-Bereich in beiden Hydrogelsystemen erreicht werden.



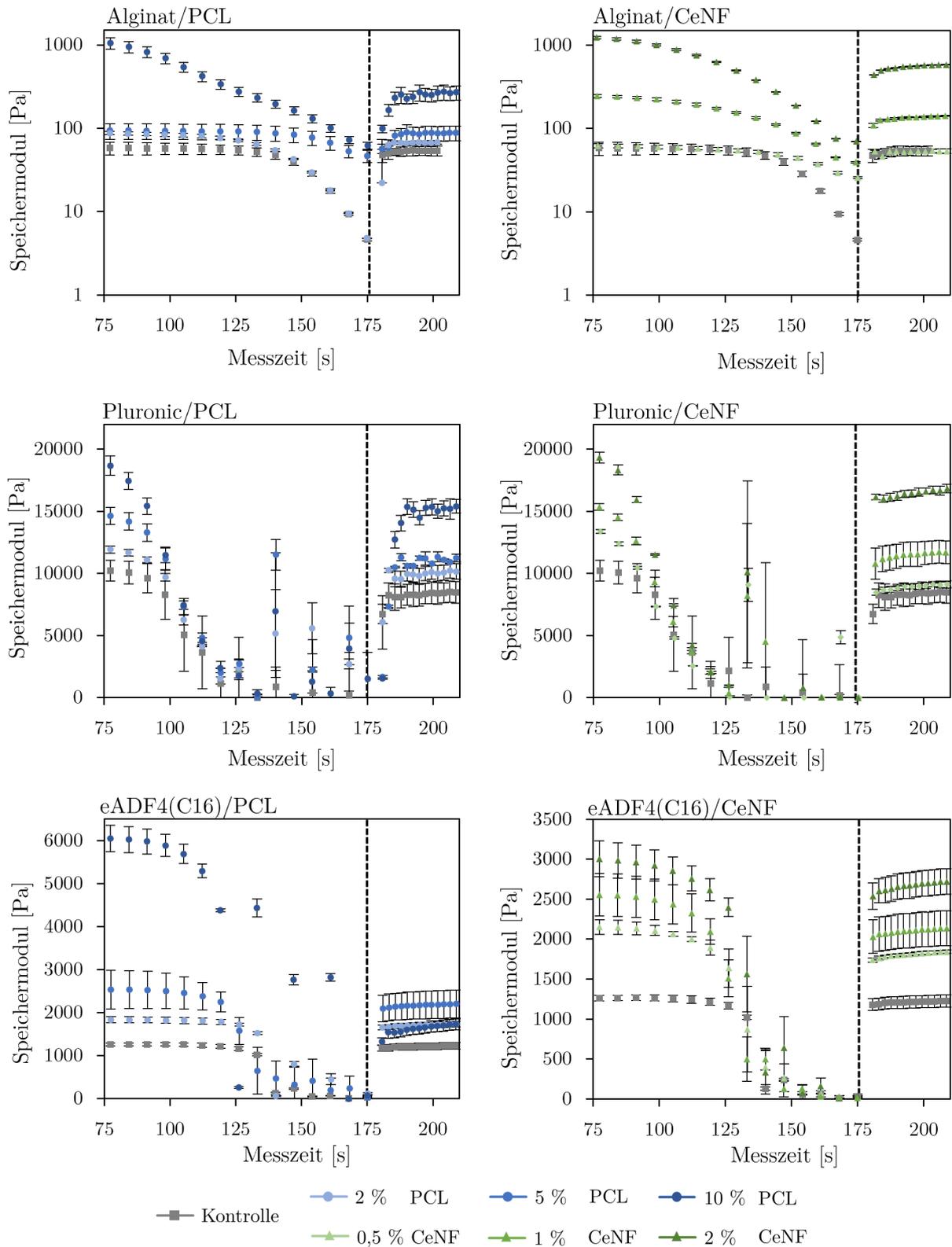
**Abbildung 3.19:** Speicher- und Verlustmodul in Abhängigkeit der Deformation im oszillatorischen Amplitudentest von unverstärktem 3% eADF4(C16) (Kontrolle) und faserverstärktem Hydrogel mit 2% w/v, 5% w/v und 10% w/v PCL-Fragmenten und 0,5% w/v, 1% w/v und 2% w/v CeNF.

Bei den eADF4(C16)-Proben liegt der Speichermodul ohne Faserverstärkung über dem Verlustmodul, was auf eine Dominanz des Festkörperverhaltens im Bereich niedriger Scherraten hinweist. Sowohl die Zugabe von PCL-Fragmenten als auch von CeNF erhöht den Speichermodul, wobei der maximale Füllgrad von PCL von 10 % w/v mit ca. 6 kPa zu einem doppelt so hohen Wert führt wie die Zugabe von 2 % w/v CeNF. In den beiden anderen Hydrogelen auf Alginat- und Pluronic-Basis konnte dagegen ein stärkerer Einfluss von CeNF auf das Verhalten der faserverstärkten Hydrogele festgestellt werden.

## **Regenerationsverhalten**

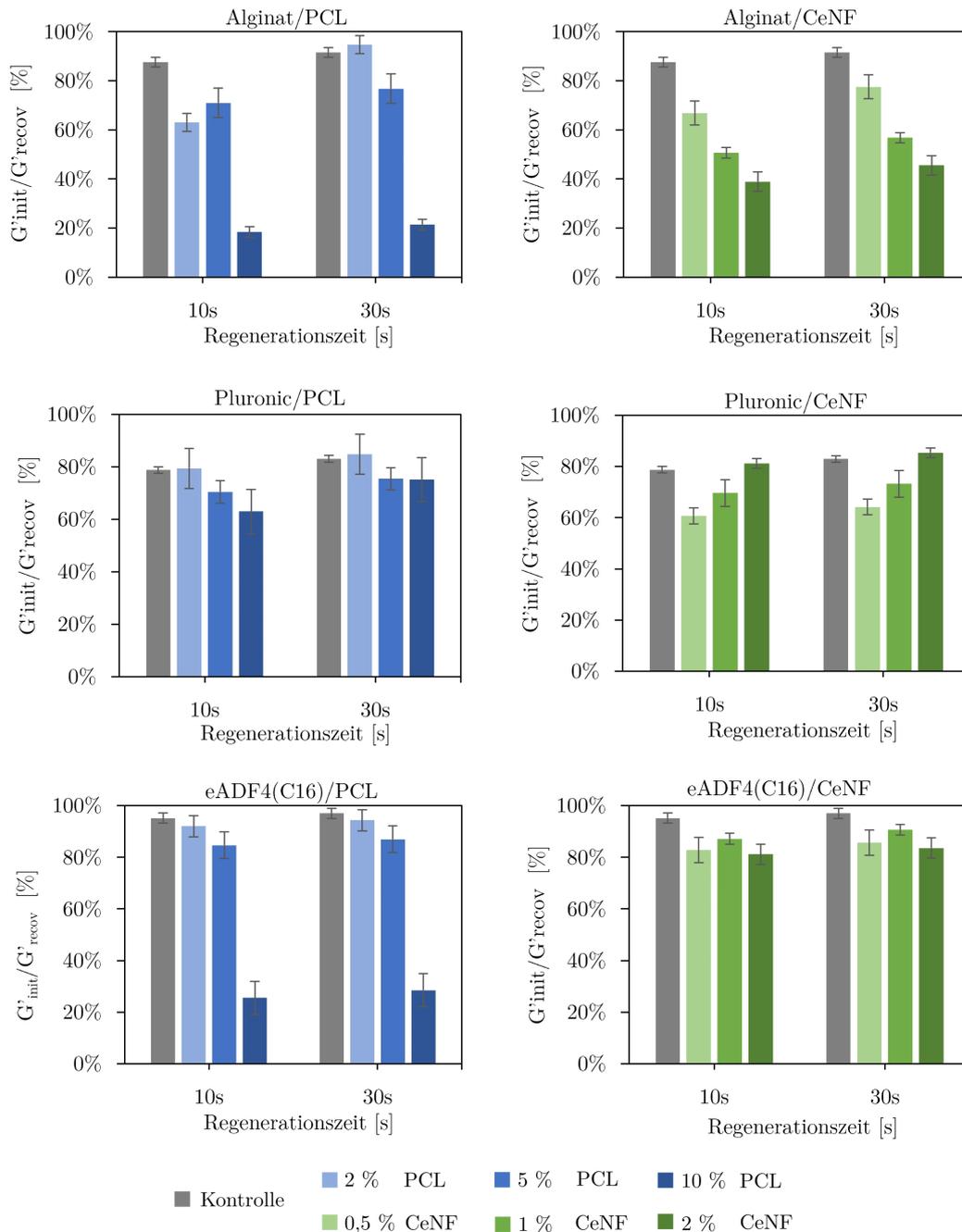
Anschließend wird das Regenerationsverhalten der Hydrogele untersucht. Dafür wird (nach Abschnitt 2.2.6), ein weiterer oszillatorischer Messabschnitt mit geringer Amplitude von 0,1 % durchgeführt und das Verhalten bei niedriger Belastung beobachtet. Dazu werden die Zeitpunkte 10 Sekunden und 30 Sekunden nach Amplitudenreduktion betrachtet, und der jeweilige Speichermodulwert verglichen. Bei allen untersuchten Proben stellt sich nach 30 s ein Plateauwert des Speichermoduls ein. Daraus ergibt sich ein Wert für die Regeneration nach 10 s, ein Wert für die Regeneration nach 30 s und ein Wert für die Geschwindigkeit der Regeneration aus der Differenz der beiden genannten Größen. Der jeweilige Plateauwert des LVE-Bereichs aus der vorherigen Messung wird als Referenz gewertet und die prozentuale Abweichung bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 3.20 und die Auswertung in Abbildung 3.21 dargestellt.

Unverstärktes Alginat 3 % regeneriert sich nach 10 s auf 88 % und nach 30 s auf 92 % des Ausgangswertes. Die Zugabe von 2 % w/v PCL-Fragmenten reduziert die Regeneration im ersten Zeitabschnitt (0 bis 10 s) auf 63 %, nach 30 Sekunden werden 95 % erreicht. Die Zugabe von 5 % w/v PCL-Fragmenten reduziert die Werte zu beiden Zeitpunkten auf 71 % (10 s) bzw. 76 % (30 s). Bei der maximal untersuchten Konzentration an PCL-Fragmenten von 10 % w/v werden nach 10 Sekunden noch 18 % des Ausgangswertes und nach 30 Sekunden noch 21 % erreicht. Wie im Amplitudentest beschrieben, wird hier ein höherer Plateauwert als Ausgangspunkt festgelegt. Dieser wird nach Belastung nicht mehr erreicht. Die Zugabe von CeNF zeigt eine ähnliche Tendenz. Eine Steigerung der CeNF Konzentration bewirkt eine kontinuierliche Reduktion des Speichermoduls auf 67 % (10 s) bzw. 78 % (30 s) bei 0,5 % w/v CeNF, weiter auf 51 % (10 s) bzw. 57 % (30 s) bei 1 % w/v CeNF und auf 39 % (10 s) bzw. 46 % (30 s) bei 2 % w/v CeNF. Auffallend sind hier die Abweichungen zwischen den Werten bei 10 s und 30 s. Die höchsten Differenzen werden bei den niedrigsten Konzentrationen an PCL (32 %) und CeNF (11 %) erreicht. Eine Erhöhung des Füllgrades führt bei PCL zu einer Reduktion der Differenz zu den beiden Zeitpunkten auf 5,8 % (5 % w/v PCL) und 3 % (10 % w/v PCL) während bei CeNF die Werte stabil bei ca. 6 % bleiben.



**Abbildung 3.20:** Regenerationsverhalten der unterschiedlichen Komposit-Hydrogele nach Belastung durch den oszillatorischen Amplitudentest. Bei Sekunde 175 wird die angelegte Deformation schlagartig reduziert und das Erreichen eines neuen Plateau-Wertes beobachtet.

Die Hydrogele aus Pluronic zeigen je nach zugesetztem Fasersystem ein unterschiedliches Verhalten. Die Zugabe von PCL führt zum Zeitpunkt 10 Sekunden zu einer schrittweisen Reduktion des Regenerationsverhalten von 78 % auf 70 % bzw. 63 %. Im Gegensatz dazu tritt die größte Abweichung vom ursprünglichen Verhalten von reinem Pluronic bei CeNF bereits beim niedrigsten Füllgrad auf. Die Zugabe von 0,5 % w/v CeNF reduziert die Regeneration auf 60 %, bei 1 % w/v CeNF steigt der Wert auf 69 % vom Ausgangswert, und bei 2 % w/v CeNF übertrifft die Regeneration von 81 % bereits den Ausgangswert.



**Abbildung 3.21:** Auswertung des Regenerationsverhalten der Komposit-Hydrogele nach Reduktion der Deformation im Anschluss an den oszillatorischen Amplitudentest. Verglichen wird der Wert des Speichermoduls jeweils 10 und 30 Sekunden nach Reduktion der Deformation.

Ein weiterer Unterschied wird in der Betrachtung der Differenz der Werte bei 10 und 30 Sekunden deutlich. Bei PCL steigt die Differenz bei höheren Füllgraden bis auf 8,2 % an. Die CeNF reduzieren jedoch in allen Füllgraden die Differenz auf Werte unterhalb des Ausgangswertes von reinem Pluronic, was für eine schnellere Regeneration des Hybridsystems spricht. Damit zeigen PCL und CeNF in diesem Hydrogelsystem gänzlich gegensätzliche Einflüsse bei Erhöhung des Füllgrades. Beide Systeme haben vergleichbare Steigerungen des maximalen Plateauwertes des Speichermoduls zur Folge.

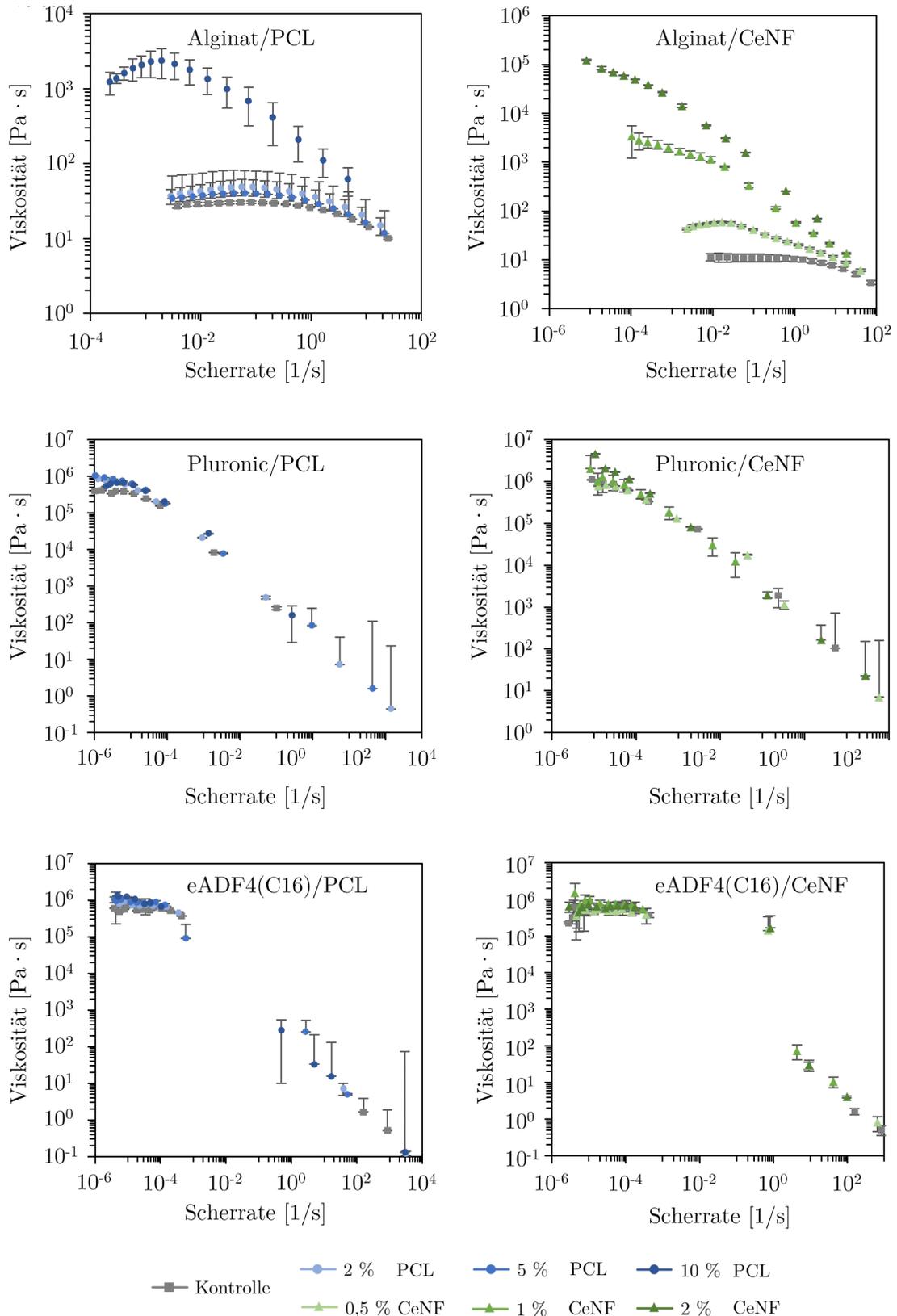
Mit einer Regeneration um 95 % nach 10 Sekunden und 97 % nach 30 Sekunden zeigt reines eADF4(C16) im Vergleich der Hydrogele die höchsten Regenerationswerte des Speichermoduls zu diesen beiden Zeitpunkten. Die Zugabe von PCL-Fasern reduziert diese Werte schrittweise 92/94 % bei 2 % w/v PCL und 85/87 % bei 5 % w/v PCL. Eine weitere Erhöhung der Faserkonzentration auf 10 % w/v hat einen drastischen Abfall der Regenerationswerte auf 26 % nach 10 Sekunden und 29 % nach 30 Sekunden zur Folge, während gleichzeitig der Plateauwert des Speichermoduls deutlich gesteigert werden kann. Die Verwendung von CeNF führt bei allen Konzentrationen zu einer geringeren Regeneration, folgt im Vergleich zu PCL keinem klaren Trend. Auch die Differenz der Werte zwischen 10 s und 30 s bleibt bei Zugabe der Fasern durchgängig im Bereich von 1,9 % bis 3,5 %.

### **Fließverhalten im Rotationsversuch**

Die Viskosität der unverstärkten und faserverstärkten Komposit-Hydrogele wird im Scherratenbereich von  $10^{-6}$  1/s bis  $10^2$  1/s im Rotationsversuch bestimmt. Eine Übersicht der Ergebnisse sortiert nach untersuchtem Hydrogel und zugesetztem Fasersystem ist in Abbildung 3.22 dargestellt.

Bei unverstärktem Alginat und der Mischung mit 2 % w/v und 5 % w/v PCL oder 0,5 % w/v CeNF bleibt die Viskosität über einen weiten Scherratenbereich nahezu konstant und beginnt im Bereich 0,1-0,5 1/s zu sinken. Der Zusatz von 10 % w/v PCL oder 1 % w/v und 2 % w/v CeNF führt zu einem früheren Übergang zum scherverdünnenden Verhalten bereits unterhalb von 0,001 1/s. Die stärkste Viskositätsabnahme zeigt 2 % w/v CeNF von über  $10^5$  Pa·s auf 10 Pa·s im betrachteten Scherratenbereich.

Die beiden Hydrogele aus Pluronic und eADF4(C16) unterscheiden sich in ihrem Verhalten von der unvernetzten viskosen Flüssigkeit aus Alginat. Die Bereiche konstanter Viskosität sind hier kürzer und weniger deutlich ausgeprägt. Beide Hydrogelsysteme zeigen ein scherverdünnendes Verhalten mit einem Abfall der Viskosität von  $10^6$  Pa·s auf unter 10 Pa·s im untersuchten Bereich. Bei Pluronic beginnt die Scherverdünnung bereits bei  $10^{-4}$  1/s, bei eADF4(C16) erst bei  $10^{-3}$  1/s.



**Abbildung 3.22:** Viskosität in Abhängigkeit von der Scherrate im Rotationsfließversuch für die Hydrogele Alginat 3%, Pluronic 20% und eADF4(C16) 3%. Untersuchte Füllgrade der Faserverstärkung 2% w/v, 5% w/v und 10% w/v PCL-Fragmente und 0,5% w/v, 1% w/v und 2% w/v CeNF mit unverstärkten Hydrogelen als Kontrolle.

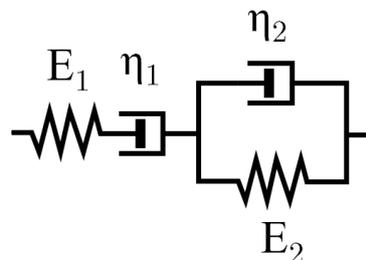
### 3.2.3 Rheologische Modellierung

Ausgehend von den beschriebenen rheologischen Messungen erfolgt eine viskoelastische Modellierung charakteristischer Materialparameter auf der Basis des integrierten Burgers-Modells (Abbildung 3.23), wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben. Dabei wurden die Messungen der Frequenzversuche mit verschiedenen Modellen abgebildet, wobei das integrierte Burgers-Modell gemäß Tabelle 3.6 die beste Übereinstimmung zeigt.

Rheologisches Modell	Bestimmtheitsmaß $R^2$
Maxwell	0,828
Kelvin-Voigt	0,639
Zener	0,924
Lethersich/Jeffreys	0,856
Burgers	0,952
integriertes Burgers	0,965

**Tabelle 3.6:** Vergleich des Bestimmtheitsmaßes bei verschiedenen rheologischen Modellen für Alginate und PCL.

Das integrierte Burgers-Modell leitet sich aus dem klassischen Burgers-Modell ab, bestehend aus einer Reihenschaltung eines Maxwell-Elements (Reihenschaltung einer Feder mit Elastizitätsmodul  $E_1$  und eines Dämpfers mit Viskosität  $\eta_1$ ) und eines Kelvin-Voigt-Elements (Parallelschaltung einer Feder mit Elastizitätsmodul  $E_2$  und eines Dämpfers mit Viskosität  $\eta_2$ ), wie in Gleichung 3.1 und 3.2 gezeigt.



**Abbildung 3.23:** Schematische Darstellung des Burgers-Modells.

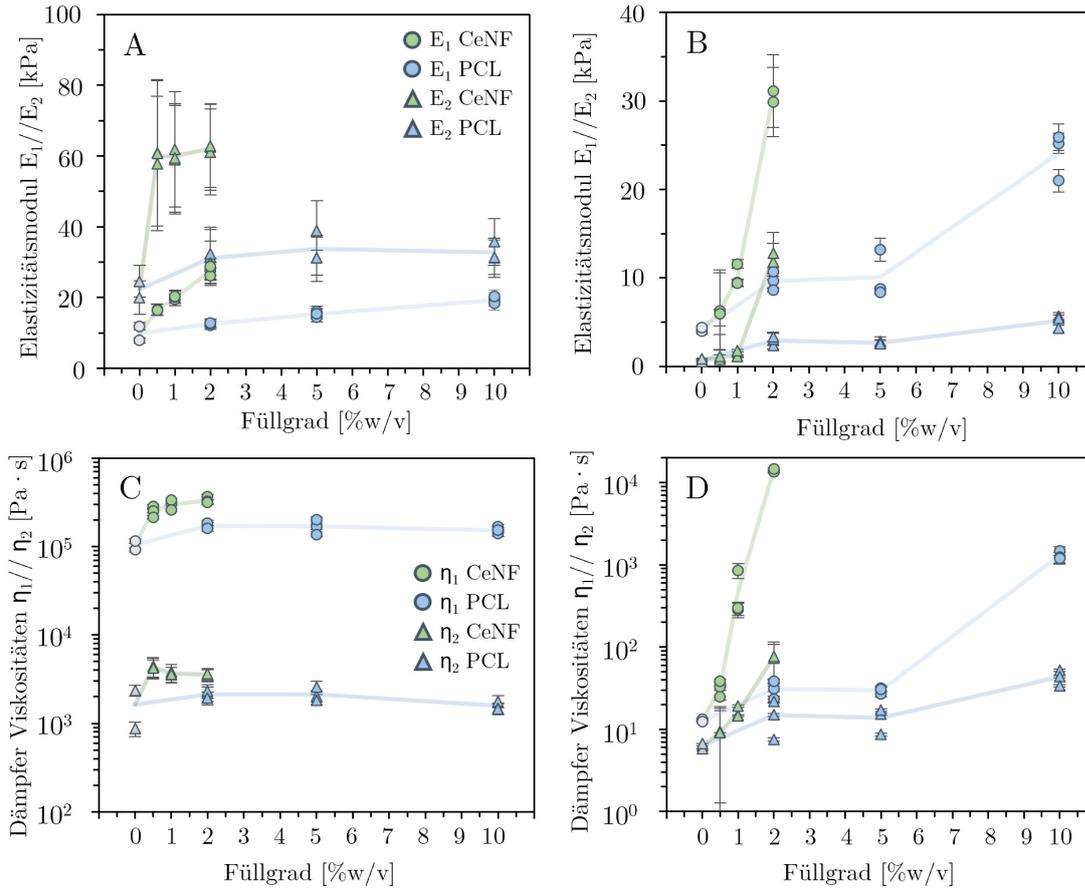
$$\text{Burgers DEQ} : \quad \sigma + A \cdot \dot{\sigma} + B \cdot \ddot{\sigma} = C \cdot \dot{\epsilon} + D \cdot \ddot{\epsilon} \quad (3.1)$$

$$\text{Burgers Int DEQ} : \quad \sigma_1 + A \cdot \sigma + B \cdot \dot{\sigma} = C \cdot \epsilon + D \cdot \dot{\epsilon} \quad (3.2)$$

Mit der Stammfunktion  $\sigma_1$  aus der zu Grunde liegenden Materialfunktion von  $\sigma$ :

$$\sigma_1 = \frac{-E' \cdot \hat{\epsilon} \cdot \cos(\omega t)}{\omega} + \frac{E'' \cdot \hat{\epsilon} \cdot \sin(\omega t)}{\omega} = -\frac{1}{\omega^2} \cdot \dot{\sigma} \quad (3.3)$$

Das integrierte Burgers-Modell erreicht dabei für alle verwendeten Materialkombinationen  $R^2$ -Werte zwischen 0,91 und 0,96. Abbildung 3.24 zeigt die Auswertung der berechneten Werte für die E-Moduln der Federelemente und die Viskositäten der Dämpfer.



**Abbildung 3.24:** Rheologische Modellparameter des integrierten Burgers-Modell in Abhängigkeit des Füllgrads der Faserverstärkung für die Hydrogele aus Alginat und Pluronic. A: Elastizitätsmodul  $E_1$  und  $E_2$  in Pluronic. B: Elastizitätsmodul  $E_1$  und  $E_2$  in Alginat. C: Dämpferviskositäten  $\eta_1$  und  $\eta_2$  in Pluronic. D: Dämpferviskositäten  $\eta_1$  und  $\eta_2$  in Alginat.

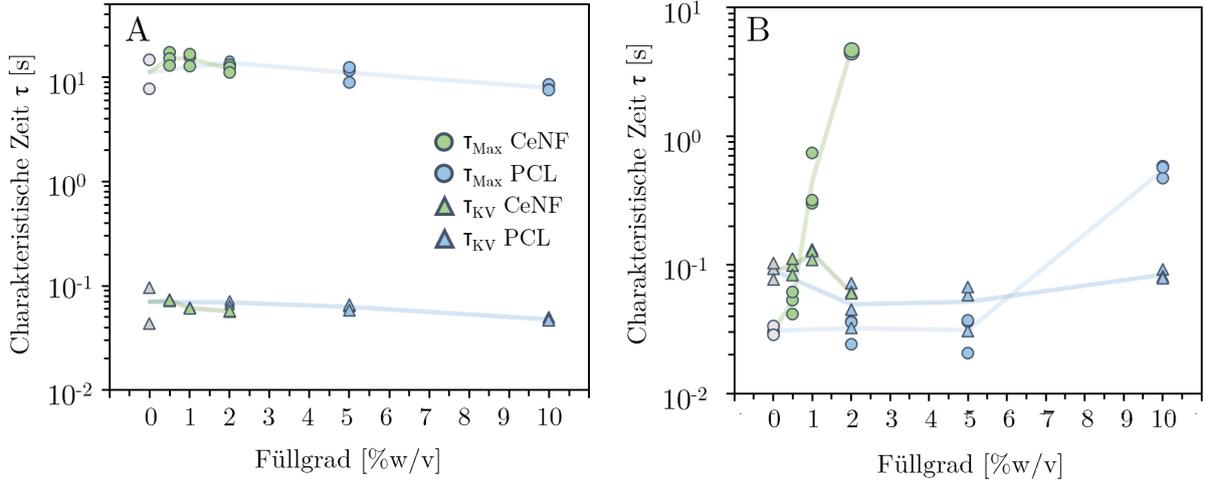
Bei allen charakteristischen Parametern ist ein konsistenter Anstieg bei Beladung der Hydrogele mit Fasern zu erkennen, unabhängig davon, ob PCL oder CeNF verwendet wird. Eine Betrachtung des Füllgrades, eingeteilt in gering (PCL: 2 % w/v, CeNF: 0,5 % w/v), mittel (PCL: 5 % w/v, CeNF: 1 % w/v) und hoch (PCL: 10 % w/v, CeNF: 2 % w/v), zeigt ein sehr ähnliches Verhalten der untersuchten Modellparameter für beide Fasersysteme in Alginat und Pluronic. Dies führt zu der Hypothese, dass aufgrund der scherrheologischen Daten und der viskoelastischen Modellierung ein ähnliches rheologisches Verhalten beider Fasersysteme auch während des Druckprozesses zu erwarten ist.

Ein Vergleich der Hydrogele Alginat 3 % und Pluronic 20 % zeigt ein unterschiedliches Verhalten bei steigendem Füllgrad. Während bei Alginat ein stetiger Anstieg der Modellparameter mit zunehmendem Füllgrad zu beobachten ist, ergibt bei Pluronic ein asymptotisches Verhalten. Eine weitere Erhöhung der Faserkonzentration über 0,5 % w/v CeNF und 2 % w/v PCL-Fragmente führt zu keinem weiteren Anstieg der Werte der Modellparameter. Ein weiterer Unterschied ist, dass bei Alginat der Elastizitätsmodul der Maxwell-Feder ( $E_1$ ) dominiert, während bei Pluronic die Federkonstante des Kelvin-Voigt-Elements ( $E_2$ ) einen stärkeren Einfluss ausübt. Diese Beobachtung ist auf den eher flüssigen Charakter der unvernetzten Alginatlösung und das stärker ausgeprägte Festkörperverhalten des Pluronic Hydrogels zurückzuführen.

Die charakteristische Zeit wird als quantifizierbare Größe verwendet, um den Einfluss der Fasersysteme auf die jeweiligen Maxwell- und Kelvin-Voigt-Elemente aufzuzeigen. Dabei wird die charakteristische Zeit für alle Materialkombinationen durch Division der Dämpfungviskosität durch den entsprechenden Elastizitätsmodul (Maxwell oder Kelvin-Voigt) nach Gleichung 3.4 berechnet.

$$\text{charakteristische Zeit } \tau = \frac{\eta}{E} \quad (3.4)$$

Wie in Abbildung 3.25-B zu erkennen ist, wird die charakteristische Zeit der Maxwell-Elemente in Alginat durch den Zusatz von CeNF um mehrere Größenordnungen erhöht. Dieser Effekt ist auch bei der Zugabe von PCL-Fasern zu beobachten, allerdings erst bei deutlich höheren Füllgraden. Die charakteristische Zeit des Kelvin-Voigt-Modells wird jedoch in beiden Fällen kaum beeinflusst. Für Pluronic kann weder für die charakteristische Zeit des Maxwell-Elements noch für die des Kelvin-Voigt-Elements eine maßgebliche Änderung durch die Zugabe der beiden Fasersysteme beobachtet werden.



**Abbildung 3.25:** Charakteristische Zeiten des Maxwell- und Kelvin-Voigt-Elements in Abhängigkeit des Füllgrads der Faserverstärkung von 2% w/v, 5% w/v und 10% w/v PCL-Fragmenten und 0,5% w/v, 1% w/v und 2% w/v CeNF für die Hydrogele aus (A) Pluronic 20% und (B) Alginate 3%.

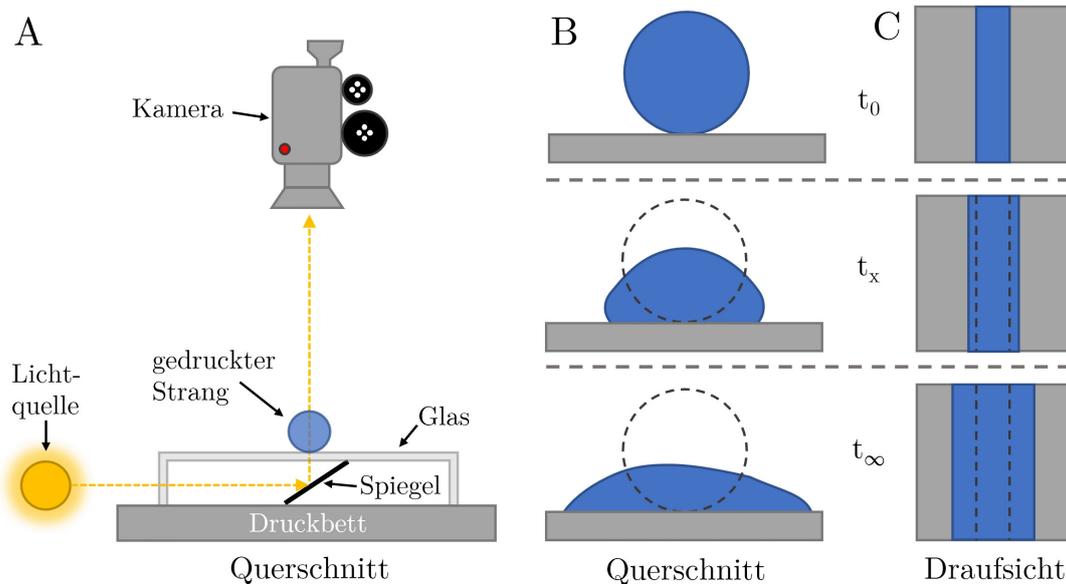
### 3.2.4 Einfluss der PCL-Fragmente auf die Strangverbreiterung

Um die Ergebnisse der Scherrheologie und deren Modellparameter mit dem tatsächlichen Druckverhalten in der Praxis vergleichen zu können, wird ein Messaufbau zur Bestimmung des zeitabhängigen Fließverhaltens des gedruckten Hydrogelstranges konzipiert. Dazu werden alle Materialkombinationen mit drei verschiedenen Geschwindigkeiten verdruckt und für die unverstärkten Hydrogele jeweils 1000/2000/3000 mm/min festgelegt. Zusammen mit dem bereits ermittelten Durchsatz aus Abschnitt 2.2.10 ergibt sich daraus der  $\kappa$ -Wert. Dieser Wert ist nach Gleichung 3.5 definiert als Quotient aus Durchsatz  $Q$  und Druckgeschwindigkeit  $v_{Druck}$  und stellt die theoretische Querschnittsfläche des gedruckten Stranges dar.

$$\kappa = \frac{Q}{v_{Druck}} \quad (3.5)$$

Damit alle Proben mit den gleichen  $\kappa$ -Werten gedruckt werden können, wird die Druckgeschwindigkeit an den jeweils ermittelten Durchsatz angepasst. Zur Auswertung des zeitabhängigen Verhaltens der gedruckten Stränge wird der Aufbau des Biodruckers modifiziert und mit einer Kamera auf der Oberseite des Druckers ausgestattet, wie in Abbildung 3.26 dargestellt. Die Kamera wird senkrecht zum Druckbett ausgerichtet, um die gedruck-

ten Proben von oben analysieren zu können. Dazu wird zusätzlich eine Neonröhre auf der Vorderseite des Druckers in Höhe des Druckbettes installiert. Das Druckbett besteht aus einer umgedrehten Petrischale aus Glas, auf deren Oberseite die Hydrogelstränge abgelegt werden. An der Unterseite der Petrischale wird ein Spiegel in einem Winkel von 30 Grad bis 45 Grad angebracht, um das Licht der Neonröhre genau in den Druckbereich senkrecht zur Kamera zu reflektieren.



**Abbildung 3.26:** Schematische Darstellung des Aufbaus (A) für die Aufnahme des Strangfließens von Hydrogelen auf einem modifizierten Druckbett im Querschnitt. Der gedruckte Strang wird über einen Spiegel von der Lichtquelle im Hintergrund beleuchtet, so dass die Kamera die Bewegung der Randbereiche des Strangs genau verfolgen kann. Zeitliche Veränderung eines viskosen gedruckten Stranges im Querschnitt (B) und in der Draufsicht (C) zum Druckzeitpunkt  $t_0$ , nach der Zeit  $t_x$  und nach unendlicher Zeit  $t_\infty$ .

Durch diese Anordnung wird ein starker Kontrast an den Rändern der gedruckten Stränge erzeugt, der den Einsatz einer Software (Kinovea) zur automatisierten Verfolgung der Bewegung ermöglicht. Damit ist eine digitale Erfassung und Analyse der Strangbewegung mit einer Auflösung im Bereich von  $100 \mu\text{m}$  möglich. Dazu werden in den erzeugten Videoaufnahmen Fixpunkte an den Rändern der gedruckten Stränge senkrecht zur Ablagerichtung gesetzt, um die initiale Strangbreite zu bestimmen. Nach Vorgabe der Randpunktbedingungen zwischen gedrucktem Strang und Druckbett kann die Software die Bewegung dieser Punkte selbständig verfolgen und die daraus resultierenden Abstände berechnen. Die zeitliche Entwicklung dieser Abstände wird für mindestens 40 Sekunden nach dem Druck aufgezeichnet und für jede Probe dreimal durchgeführt. Aus diesen Werten, in Abhängigkeit von den  $\kappa$ -Werten, können Rückschlüsse auf das Fließverhalten der untersuchten Hydrogelstränge unmittelbar nach dem Druck gezogen werden.

Es werden zwei unterschiedliche Ansätze untersucht, zum einen werden bei konstantem Füllgrad sechs verschiedene Werte für  $\kappa$  getestet, zum anderen wird bei konstantem  $\kappa$  der Füllgrad variiert, um nur den Einfluss der Fasern auf die Formstabilität zu untersuchen. Für die mathematische Beschreibung des Fließverhaltens des gedruckten Strangs wird ein neuer Ansatz auf Basis einer Exponentialfunktion (Gl. 3.6) etabliert und um die Faktoren Strangbreite nach unendlich langer Zeit und Zeitverzögerung erweitert.

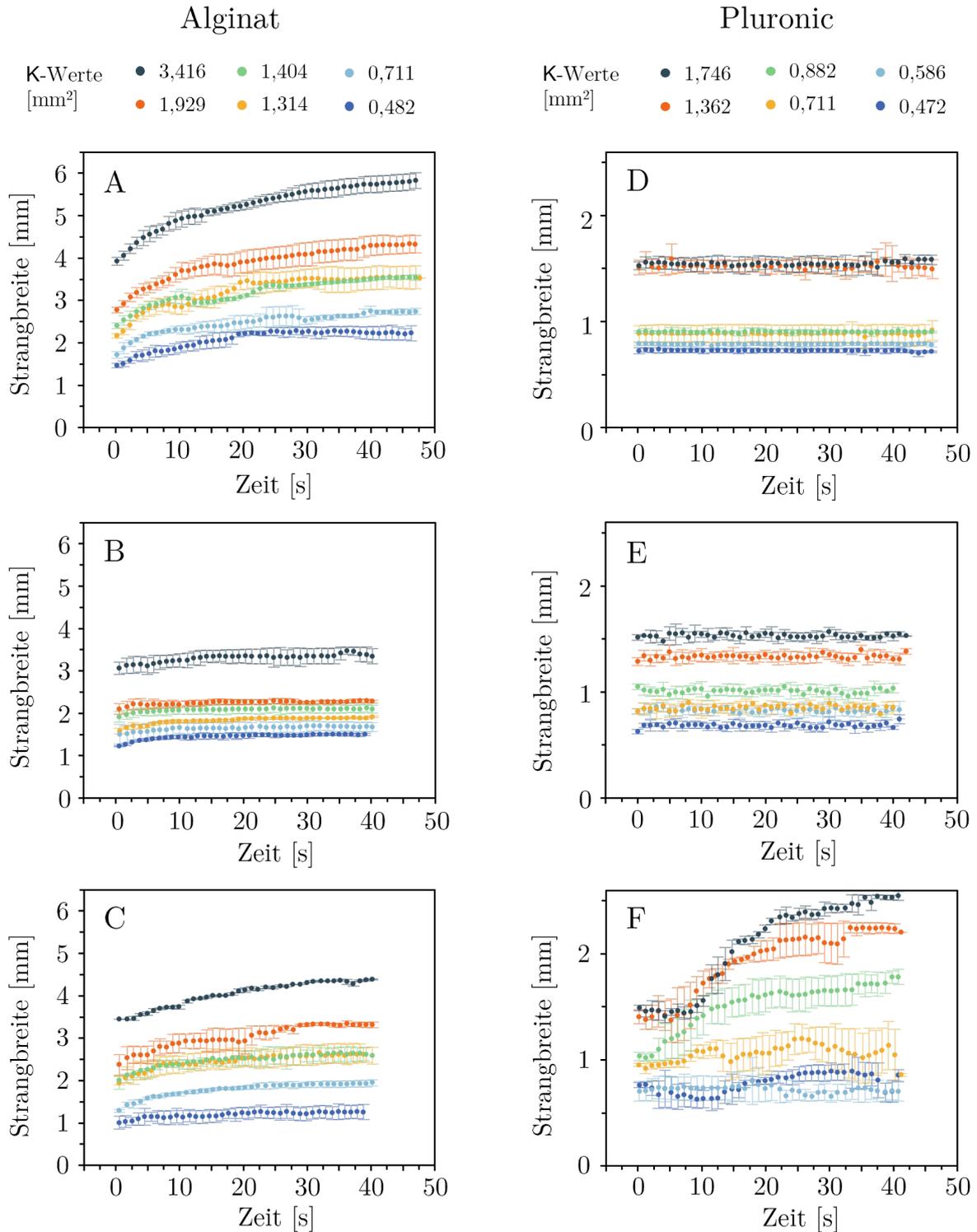
$$d(t) = d_{\infty} - \Delta d \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3.6)$$

In dieser Form steht  $d(t)$  für die zeitabhängige Breite des gedruckten Stranges,  $d_{\infty}$  für die Strangbreite im Gleichgewicht nach unendlich langer Zeit und  $\tau$  für die bereits beschriebene charakteristische Zeit. Der Faktor  $\Delta d$  wird als zusätzlicher Parameter eingeführt, um die zeitliche Verzögerung der Datenerfassung gegenüber des tatsächlichen Beginn des Drucks auszugleichen.

Der proportionale Zusammenhang zwischen  $\kappa$  und  $d(t)$  wird in allen Versuchen deutlich. Ein höherer Wert für  $\kappa$  führt dabei auch immer zu einer größeren zeitabhängigen Strangbreite. Die Größe  $\kappa$  kann daher auch als Maß für die Querschnittsfläche des gedruckten Stranges interpretiert werden und spielt damit eine zentrale Rolle bei der systematischen Analyse der Druckergebnisse von Hydrogelen. Mit diesem einfachen Ansatz können praxisnahe Druckversuche mit leicht zugänglichen Messwerten aus der Rheologie korreliert werden.

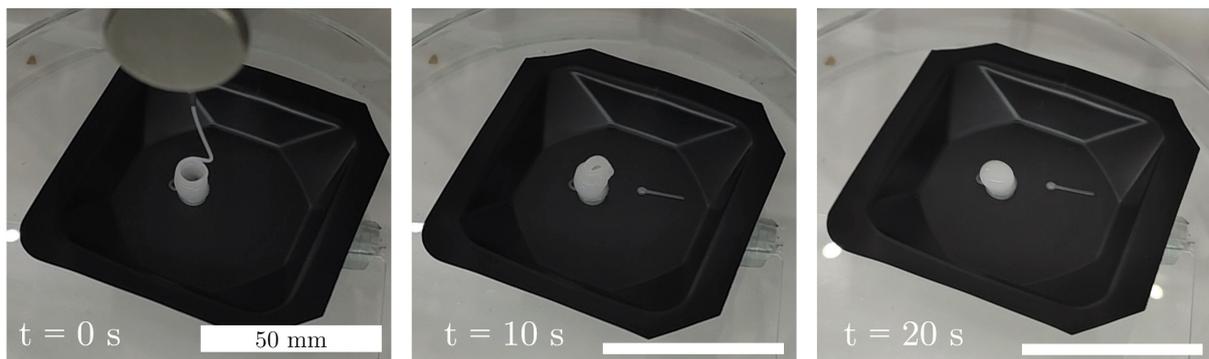
Wie in Abbildung 3.27-C zu sehen ist, zeigen die Mischungen aus Alginate und PCL-Fragmenten eine deutliche Abhängigkeit der Strangbreite von der Zeit und damit ein ähnliches Verhalten wie das unverstärkte Alginate (3.27-A). Die Strangbreite nimmt mit der Zeit deutlich zu bis ein Plateauwert erreicht wird und sich ein Gleichgewichtszustand zwischen schwerkraftinduziertem Fließen und der Oberflächenspannung des Materials einstellt.

Der Effekt der Fasern wird beim Vergleich der beiden maximalen Füllgrade (Abb. 3.27 B&D) mit der reinen Alginatelösung (Abb. 3.27-A) deutlich. Zum einen wird die initiale Strangbreite bei  $t=0$  kleiner, zum anderen wird aber in beiden Fällen auch die Strangbreite im Gleichgewichtszustand  $d_{\infty}$  deutlich reduziert. Dieser Effekt ist jedoch bei Zugabe von CeNF stärker ausgeprägt als bei Zugabe von PCL-Fragmenten.



**Abbildung 3.27:** Zeitliche Entwicklung der Strangbreite nach dem 3D-Drucken für vordefinierte  $\kappa$ -Werte. Dargestellt sind unterschiedlichen Füllgrade der Faserverstärkung für Alginate 3 % (A;B;C) und Pluronic 20 % (D;E;F). Verglichen werden die unverstärkten Hydrogele (A&D) mit dem jeweils maximalen Füllgrad an Faserverstärkung von 2 % w/v CeNF (B&E) und 10 % w/v PCL-Fragmenten (C&F).

Im Gegensatz dazu zeigt Pluronic bereits ohne Fasern eine sehr gute Formstabilität (Abb. 3.27-D), die auch bei Variation der  $\kappa$ -Werte konstant bleibt und sich durch die Zugabe von CeNF nicht verändert (Abb. 3.27-E). Die Zugabe von PCL führt jedoch zu einem anderen Verhalten. Während sich CeNF und PCL in der Auswertung der scherrheologischen Untersuchungen sehr ähnlich verhalten, führt die Zugabe von PCL zu Pluronic in den Druckversuchen zu einem Verlust der Formstabilität des Hydrogels wie in Abbildung 3.28 gezeigt. Nach einer Zeitverzögerung von ca. 5 s ist bei PCL-Konzentrationen von 5 % w/v und 10 % w/v und  $\kappa$ -Werten über 0,8 ein deutliches Fließen des gedruckten Stranges zu beobachten.



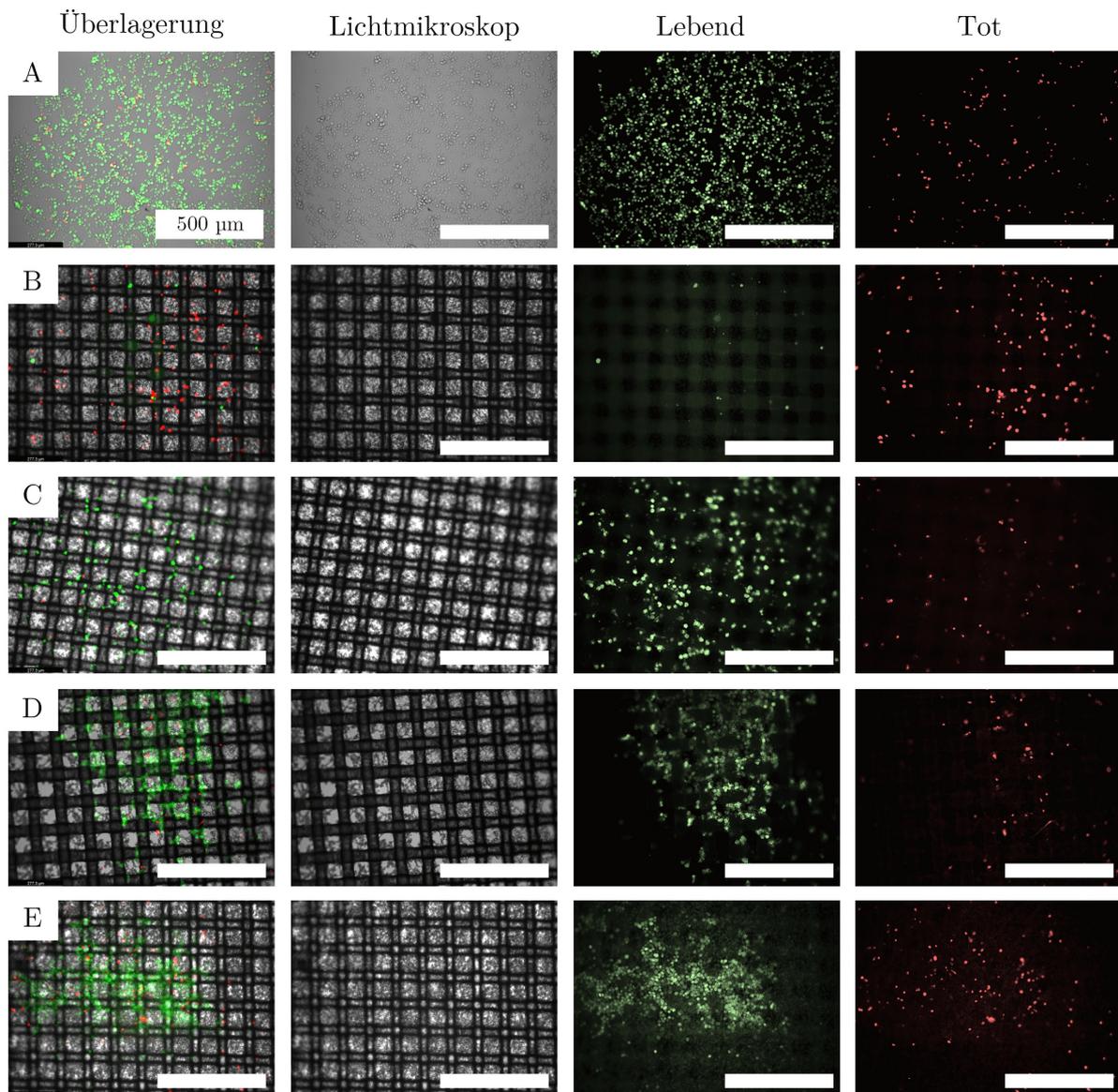
**Abbildung 3.28:** Zeitliche Entwicklung eines gedruckten Konstrukts aus Pluronic 20% mit Zugabe von 10 % w/v PCL-Faserfragmenten. Im Zeitintervall von 20 s kollabiert der gedruckte Hohlzylinder komplett und bildet einen Tropfen.

Dieser bis dato nicht beschriebene Effekt kann aus den scherrheologischen Daten nicht vorhergesagt werden. Obwohl rheologische Untersuchungen ein wertvolles Werkzeug zur Charakterisierung des Fließverhaltens von Hydrogelen sind, können sie bei der Übertragung auf das praxisnahe Druckverhalten Limitierungen aufweisen. Insbesondere die Wahl der jeweiligen rheologischen Untersuchungsmethode (Scherrheometer, Kapillarrheometer...) hat einen starken Einfluss auf die Qualität der Ergebnisse. Diese können im Modell stark von den tatsächlichen Bedingungen abweichen, denen das Hydrogel in der Anwendung ausgesetzt ist. Darüber hinaus können solche Experimente nur begrenzte Informationen über das Verhalten von Hydrogelen unter dynamischen Bedingungen liefern, wie sie bei der späteren Reifung im Bioreaktor auftreten. Daher ist es wichtig, dass bei der Entwicklung von Hydrogelanwendungen sowohl rheologische Untersuchungen als auch praxisnahe Experimente durchgeführt werden, um ein umfassendes Verständnis des Verhaltens unter realen Bedingungen zu erlangen.

### 3.3 Analyse der Fragment-Zell-Interaktion

#### 3.3.1 Biofunktionalisierung von PCL-Faserfragmenten

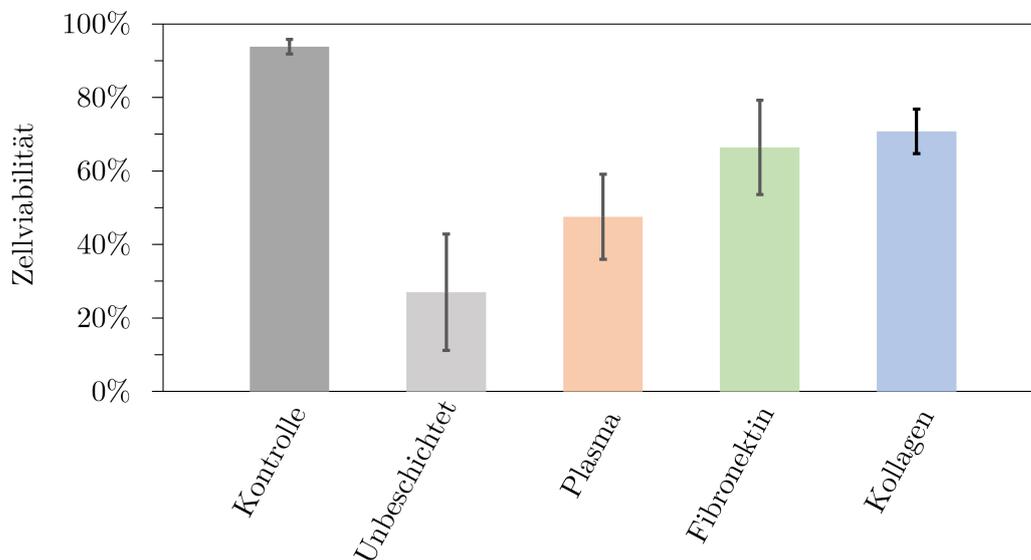
Neben dem Einfluss der Faserfragmente auf die rheologischen Eigenschaften der Biotinten und die erzielbaren Druckergebnisse spielt die Wechselwirkung der Matrix mit den eingesetzten Zellen eine wichtige Rolle für die Anwendung in der Biofabrikation. Im Folgenden werden verschiedene Arten der Zell-Faser-Interaktion näher betrachtet, um den Einfluss der Fasern auf das Verhalten und das Überleben der Zellen zu untersuchen (Abb. 3.29).



**Abbildung 3.29:** Repräsentative Aufnahmen der Zellbesiedlung auf unterschiedlich beschichteten PCL-Fragmenten auf einem Trägervlies. Verglichen wird die (A) Kontrollgruppe mit (B) unbeschichteten, (C) plasmabehandelten, (D) fibronectin- und (E) kollagenbeschichteten Faserfragmenten.

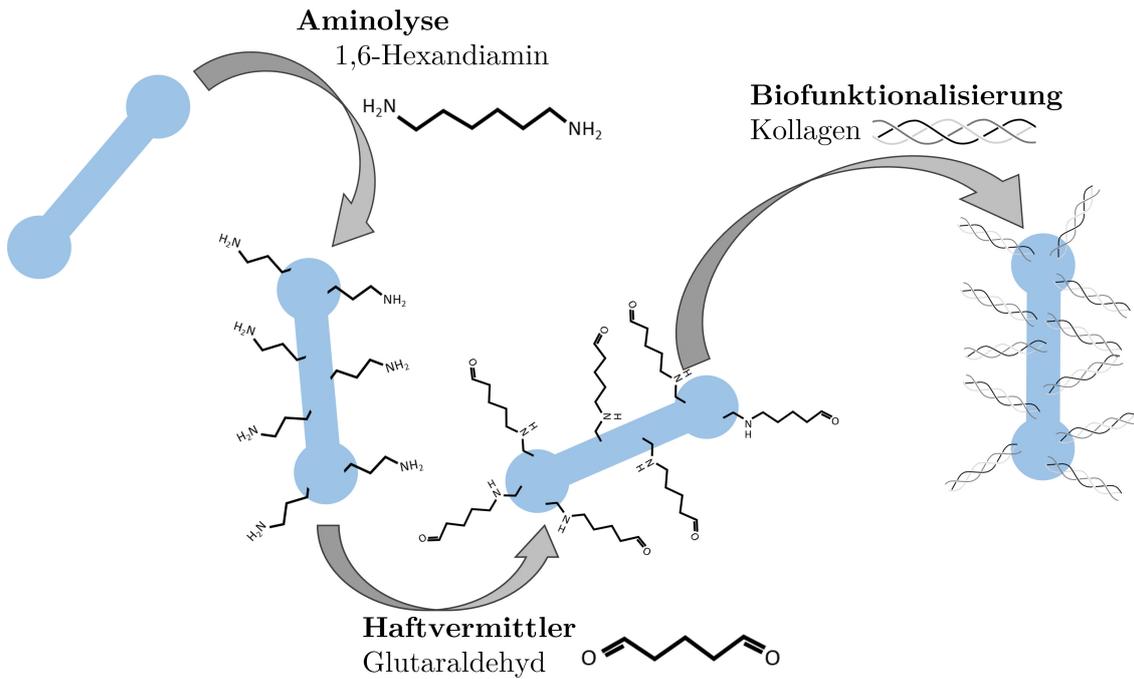
Durch eine Modifikation der Oberfläche der Faserfragmente kann die Wechselwirkung sowohl mit der Hydrogelmatrix als auch mit verschiedenen Zelltypen beeinflusst werden. Im Folgenden wird die im Abschnitt 2.2.5 beschriebene Oberflächenbeschichtung mit Kollagen Typ 1 untersucht, sowie mit einer einfachen Plasmabehandlung und einer Fibronectinbeschichtung verglichen. Zum Vergleich der Zellviabilität auf unterschiedlich beschichteten PCL-Oberflächen werden aus elektrogewebenen PCL-Vlies geschnittene Stücke mit Kollagenlösung funktionalisiert. Anschließend werden die Oberflächen mit Zellsuspensionen gleicher Konzentration inkubiert und nach 22 Stunden mittels Lebend-/Tot-Färbung untersucht.

Die Ergebnisse der Auswertung sind in Abbildung 3.30 dargestellt und zeigen eine deutlich verringerte Zellviabilität von ca. 27% auf unbeschichteten PCL-Vliesen im Vergleich zur Positivkontrolle einer beschichteten Zellkulturplatte. Die Behandlung der Oberfläche mit Plasma erhöht den Anteil der überlebenden Zellen auf  $47,5 \pm 11,5\%$  und damit auf etwa das Doppelte der unbeschichteten Oberfläche. Durch die Beschichtung mit Fibronectin und Kollagen kann der Anteil lebender Zellen weiter auf  $66,4 \pm 12,8\%$  (Fibronectin) bzw.  $70,8 \pm 6,1\%$  (Kollagen) gesteigert werden, wobei die Beschichtung mit Kollagen hier die höchsten Werte mit der geringsten Standardabweichung aufweist. Darauf aufbauend wird die Kollagenbeschichtung in diesem Abschnitt näher charakterisiert und als Standard für alle folgenden Zellkulturversuche verwendet.



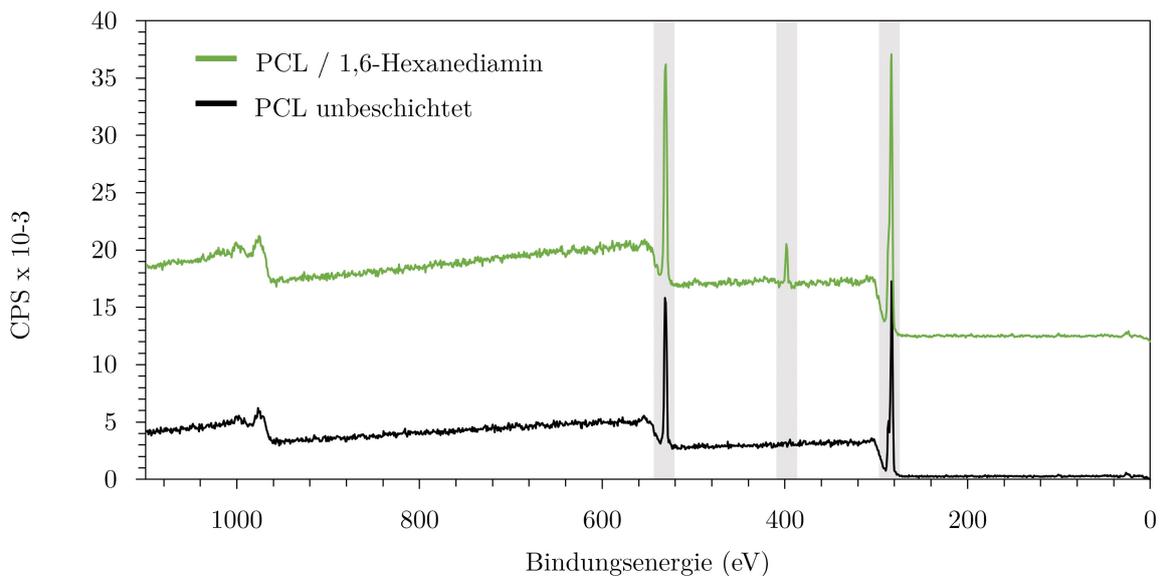
**Abbildung 3.30:** Zellviabilität von BALB/3T3-Fibroblasten auf PCL-Faserfragmenten mit unterschiedlicher Beschichtung (unbeschichtet/Plasma/Fibronectin/Kollagen) im Vergleich zur beschichteten Zellkulturplatte als Positivkontrolle (n=7).

Zur Validierung der Kollagenbeschichtung werden EDX- und FTIR-Analysen durchgeführt. Die einzelnen Schritte der Beschichtung sind in Abbildung 3.31 dargestellt.



**Abbildung 3.31:** Schematische Darstellung der einzelnen Schritte und der beteiligten chemischen Gruppen bei der Kollagenbeschichtung von PCL-Faserfragmenten.

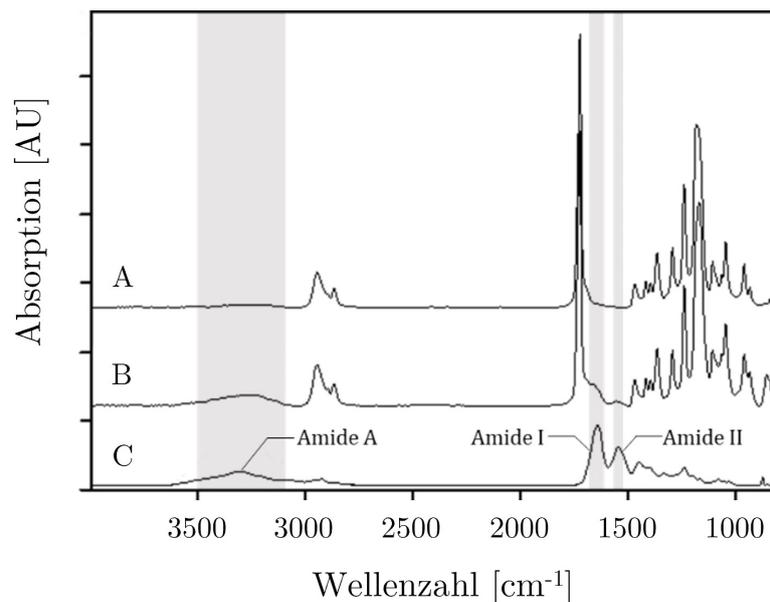
Da Wasserstoff in der Röntgenphotoelektronenspektroskopie kein Signal erzeugt, bleiben die Elemente Kohlenstoff und Sauerstoff, um die Reinheit der PCL-Oberfläche zu bestimmen. Diese sind im Spektrum der reinen PCL-Oberfläche in Abbildung 3.32 bei 284 eV (Kohlenstoff) und 540 eV (Sauerstoff) deutlich zu erkennen.



**Abbildung 3.32:** EDX-Analyse der PCL-Faserfragmente vor und nach dem ersten Prozessschritt der Beschichtung, der Behandlung mit 1,6-Hexandiamin. Markierungen bei 284 eV (Kohlenstoff), 400 eV (Stickstoff) und 540 eV (Sauerstoff).

Zusätzlich kann mit Hilfe der Röntgenphotoelektronenspektroskopie der erste Schritt der Beschichtung mit Aminogruppen auf der Oberfläche verifiziert werden. Nach der Reaktion mit 1,6-Hexandiamin und den anschließenden Waschschrinen kann ein zusätzlicher Peak bei 400 eV beobachtet werden, der charakteristisch für die Anwesenheit von Stickstoff auf der Probenoberfläche ist.[130] Eine Quantifizierung der Messungen ergibt einen Anteil von 5,9 % Stickstoff nach der Behandlung im Vergleich zu 0 % nachweisbarem Stickstoff vor der Behandlung.

Der Nachweis der erfolgreichen Beschichtung der PCL-Oberfläche mit Kollagen erfolgt mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektrometrie (FTIR) (Abb. 3.33). Wie in Abschnitt 2.2.12 beschrieben, werden unbeschichtete PCL-Proben mit Proben nach dem letzten Reinigungs- und Trocknungsschritt vermessen und miteinander verglichen. Die charakteristischen Banden für PCL liegen bei den Wellenzahlen  $2945\text{ cm}^{-1}$  und  $2866\text{ cm}^{-1}$  für die C-H-Streckschwingung, bei  $1720\text{ cm}^{-1}$  (Streckschwingung der Carbonylgruppen, C=O),  $1295\text{ cm}^{-1}$  (C-O-Streckschwingung) und bei  $1240\text{ cm}^{-1}$  bzw.  $1168\text{ cm}^{-1}$  für die Deformationsschwingung der C-O-C-Bindung.[131]

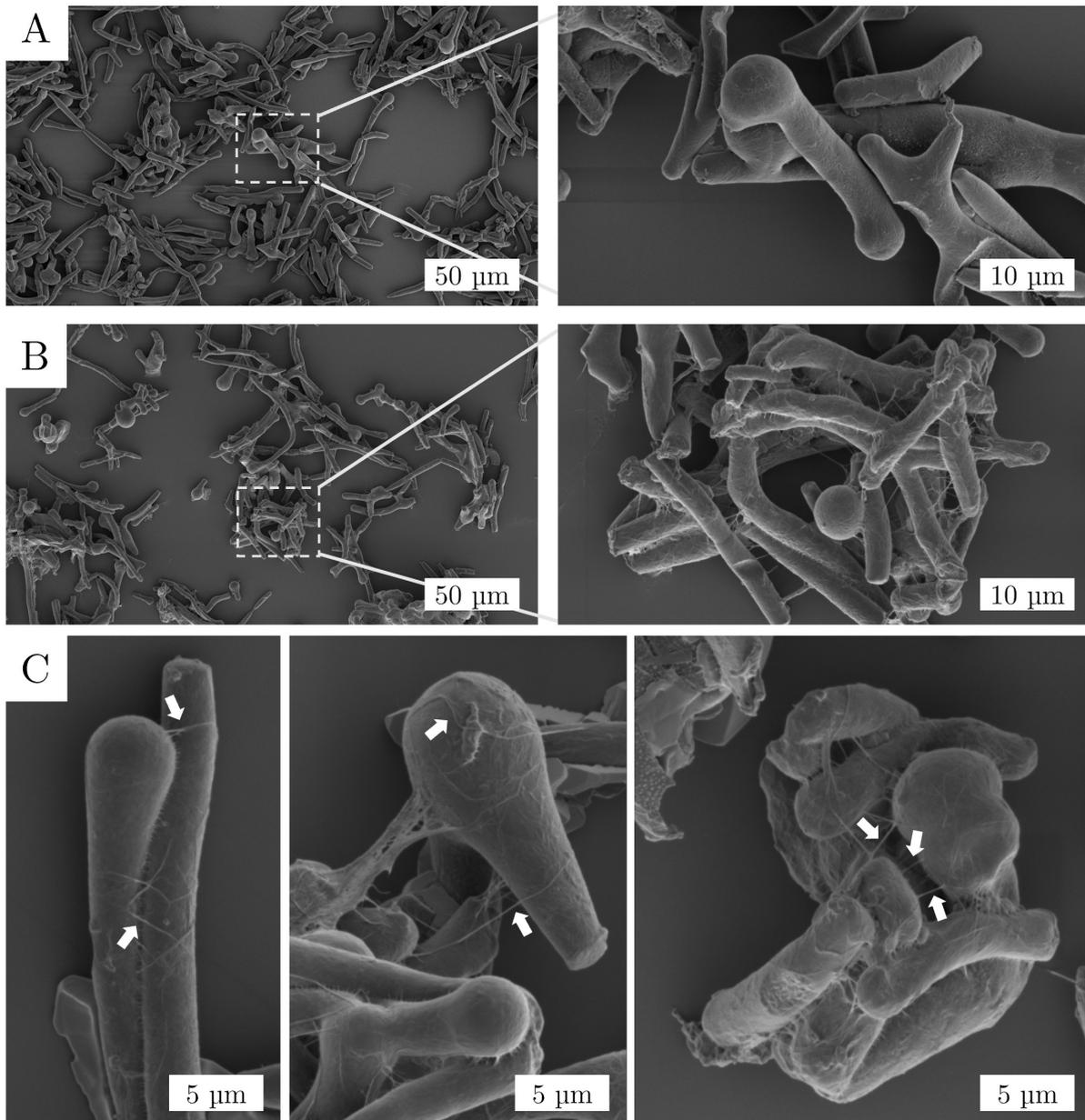


**Abbildung 3.33:** FTIR-Analyse von (A) unbeschichteten PCL-Fasern, (B) beschichteten PCL-Fasern und (C) reinem Kollagen. Die charakteristischen Banden für Kollagen liegen bei den Wellenzahlen  $3299\text{ cm}^{-1}$ ,  $1647\text{ cm}^{-1}$  und  $1534\text{ cm}^{-1}$ .

Die für PCL angegebenen Schwingungen können sowohl bei den unbeschichteten als auch bei den beschichteten Proben nachgewiesen werden. Daraus kann geschlossen werden, dass sich die PCL-Oberfläche durch die chemische Modifikation nicht grundlegend verändert. Durch die Beschichtung mit Kollagen Typ 1 werden weitere Schwingungsbanden an den Positionen  $3299\text{ cm}^{-1}$ ,  $1647\text{ cm}^{-1}$  und  $1534\text{ cm}^{-1}$  detektierbar. Diese können den von

Kollagen bekannten Schwingungsbanden Amid A, Amid I und Amid II zugeordnet werden, was die Anwesenheit von Kollagen auf der Faseroberfläche bestätigt.[132]

Neben der chemischen Zusammensetzung der Oberfläche wird die Morphologie der Faserfragmente vor und nach dem Beschichtungsprozess rasterelektronenmikroskopisch untersucht und in Abbildung 3.34 repräsentativ dargestellt. Ein Vergleich der unbeschichteten und beschichteten Proben zeigt die Unversehrtheit der strukturellen Integrität der PCL-Fragmente nach der Modifikation.

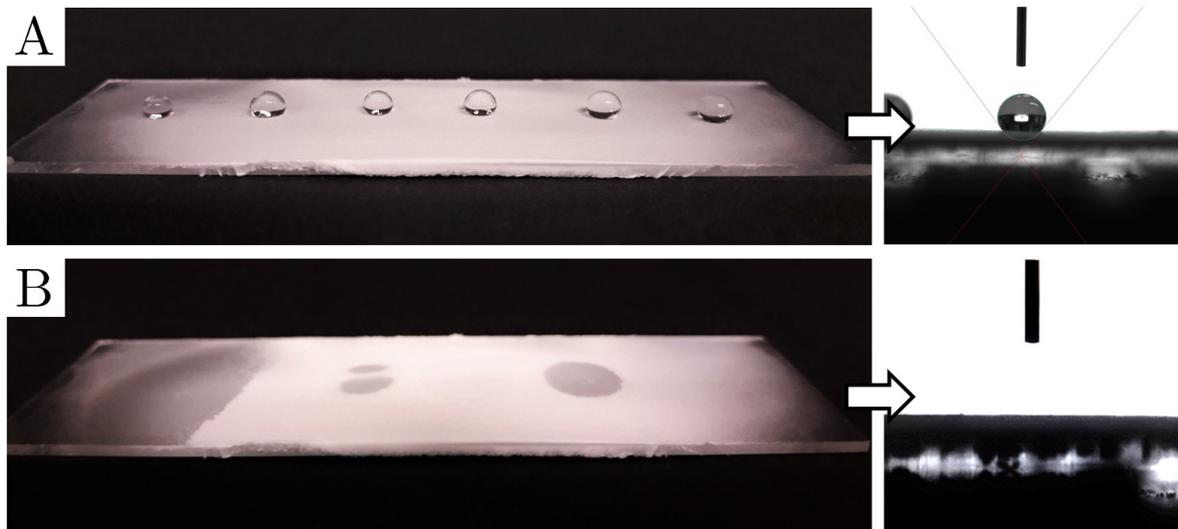


**Abbildung 3.34:** REM-Analyse der einzelnen PCL-Fragmente (A) vor und (B) nach der Kollagenbeschichtung. Repräsentative Aufnahmen von (C) Kollagenfibrillen auf der Oberfläche der PCL-Fragmente sind mit Pfeilen markiert.

Zusätzlich sind nun feinere faserartige Strukturen auf der zuvor glatten Faseroberfläche nachweisbar. Diese können dem verwendeten Kollagen Typ 1 zugeordnet werden, da die Bildung von Nanofibrillen mit einem Durchmesser von 50-500 nm als morphologisches Merkmal dieses Kollagentyps gut dokumentiert ist.[133]

Ein wichtiger Faktor für die Wechselwirkung der Faserfragmente bei der späteren Anwendung im Hydrogel und im direkten Kontakt mit Zellen ist die Hydrophobizität der Oberfläche. Während stark hydrophobe Partikel in wässriger Umgebung (im Hydrogel ist der Wasseranteil größer 90%) stark zur Agglomeration neigen, können hydrophile Partikel stabil im Medium gemischt und verteilt werden. Kontaktwinkelmessungen von unbeschichteten PCL-Fasern als Vlies nach dem Spinnen ergeben Winkel von  $129 \pm 1$  Grad ( $n=10$ ) und damit stark hydrophobe Oberflächen. Ein Vergleich mit Fasern nach der Kollagenbeschichtung (Abbildung 3.35) zeigt die Abnahme der Hydrophobizität bis hin zu einer vollständig benetzbaren Oberfläche mit nicht mehr messbaren Kontaktwinkeln.

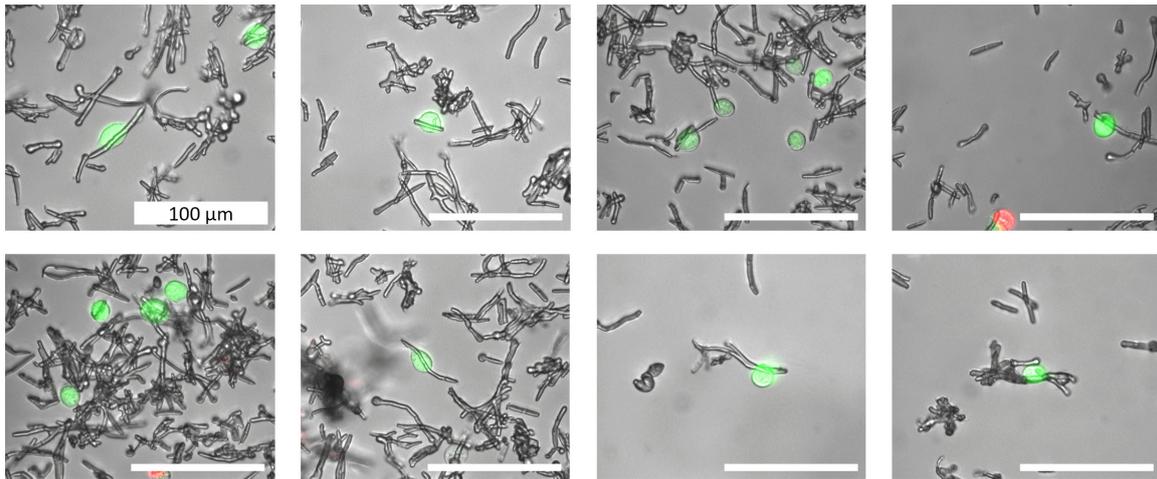
Die vorgestellten Messungen bestätigen den Erfolg des entwickelten Verfahrens zur Oberflächenbeschichtung der PCL-Faserfragmente mit Kollagen. Damit steht für die weiteren Zellkulturversuche eine attraktive bioaktive Oberfläche mit zusätzlichen Interaktionsmöglichkeiten für Zellmembranoberflächenproteine zur Verfügung. Darüber hinaus bietet die Beschichtung durch die Verringerung der Hydrophobizität weitere Vorteile in der Weiterverarbeitung. So wird die Gefahr der Agglomeratbildung in der wässrigen Umgebung des Hydrogels reduziert.



**Abbildung 3.35:** Repräsentative makroskopische Aufnahmen der Kontaktwinkelmessung von (A) unbeschichteten und (B) kollagenbeschichteten PCL-Vliesen.

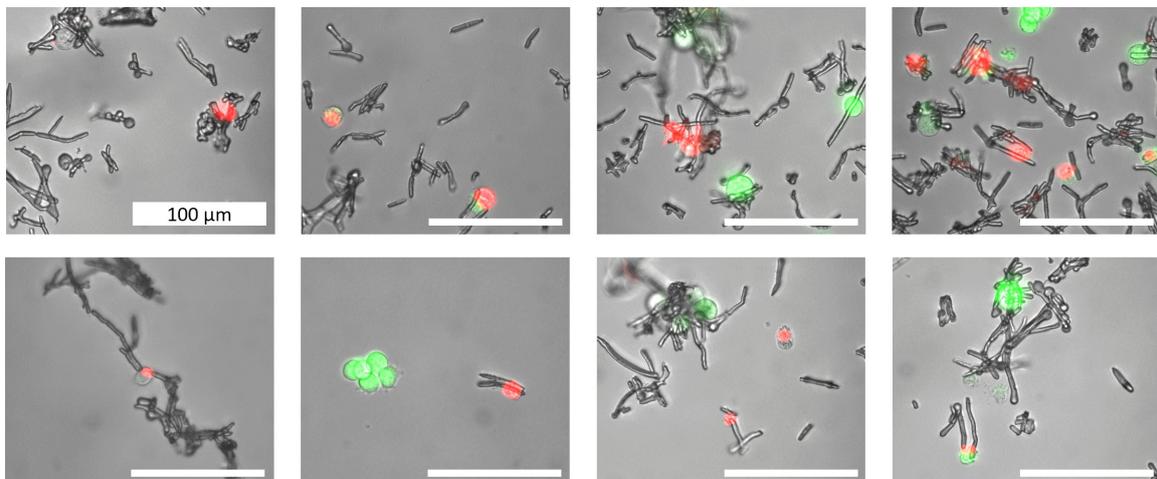
### 3.3.2 Adhäsion und Zellviabilität

Adhäsionsexperimente mit BALB/3T3-Fibroblasten werden, wie unter 2.2.14 beschrieben, durchgeführt. Dazu werden die Zellen zunächst mit PCL-Fasern in Medium inkubiert und im Überkopfschüttler geschüttelt, anschließend zentrifugiert und auf Zellkulturplatten kultiviert. Abbildung 3.36 zeigt die Interaktion von BALB/3T3-Fibroblasten mit einzelnen PCL-Faserfragmenten und Faserbündeln im Adhäsionsexperiment.



**Abbildung 3.36:** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von BALB/3T3-Fibroblasten nach 72 Stunden in Kontakt mit PCL-Faserfragmenten.

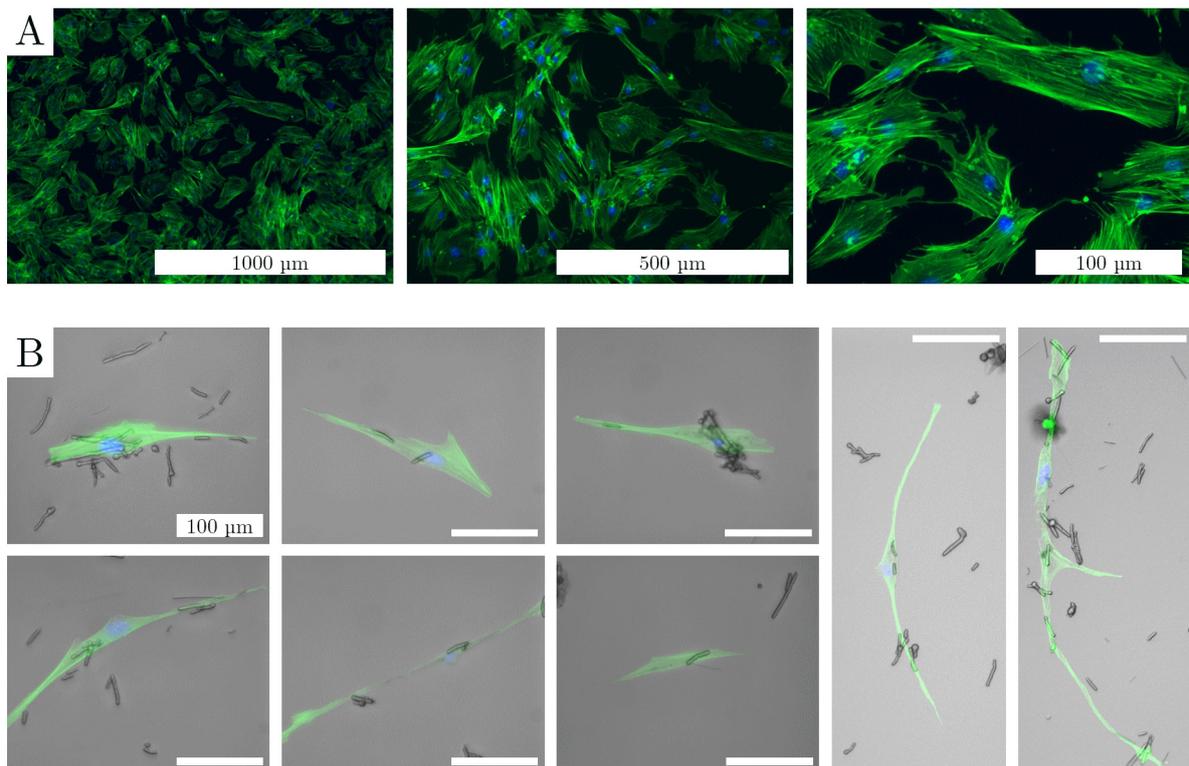
Eine weitere Beobachtung bei diesen Versuchen ist die erhöhte Mortalität von Zellen, die an mehreren Fasern adhären (Abbildung 3.37). Diese sind bei der Ausbringung auf die Zellkulturplatte und den nachfolgenden Waschschritten durch die Relativbewegung der Fragmente zueinander hohen Scherkräften ausgesetzt.



**Abbildung 3.37:** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von BALB/3T3-Fibroblasten nach 72 Stunden in Kontakt mit PCL-Faserfragmenten. Zellen, die an mehreren Fasern gleichzeitig anhaften, zeigen eine erhöhte Zellmortalität.

Eine Zelladhäsion vor dem eigentlichen Druckvorgang wird aus diesem Grund nicht empfohlen. Bei den Druckversuchen kommen Fasern und Zellen daher erst kurz vor dem Druckvorgang in Kontakt. Im Vergleich zu den BALB/3T3-Zellen lassen die deutlich größeren BJ-Fibroblasten auch Rückschlüsse auf die Morphologie der Zellen in Kontakt mit den Faserfragmenten zu. Die Positivkontrolle ohne Fasern in Abbildung 3.38-A zeigt ein gutes Zellwachstum und die Ausbildung stabiler Zell-Zell-Interaktionen mit einem geringen mittleren Aspektverhältnis von  $2,1 \pm 1,1\mu\text{m}$  (längste Achse geteilt durch kürzeste Achse der Zelle,  $n=25$ ) in der Morphologie einzelner Zellen.

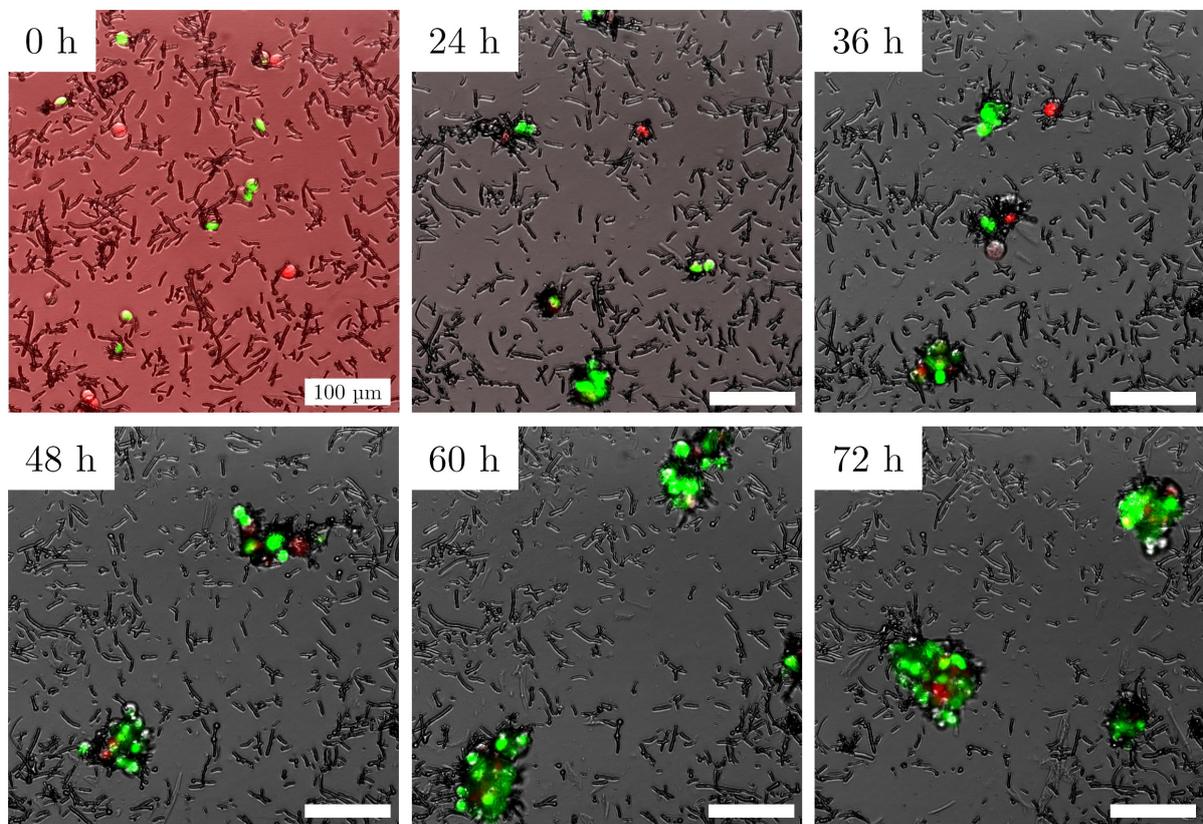
Bei Zellen, die zuvor mit Fasern inkubiert wurden (Abb. 3.38-B), ist eine Ausdehnung des Zellkörpers entlang der Faserachsen zu beobachten. Die untersuchten Zellen interagieren hier überwiegend mit mehreren Faserfragmenten oder kleineren Aggregaten. Die Interaktion mit einzelnen Fasern außerhalb der Aggregate führt zu einer ausgeprägten Streckung des Zellkörpers entlang der Faserachse und darüber hinaus. Dabei werden Abstände von bis zu  $100\ \mu\text{m}$  überbrückt und mittlere Aspektverhältnisse von  $10,8 \pm 4,7\mu\text{m}$  ( $n=25$ ) erreicht.



**Abbildung 3.38:** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von BJ-Fibroblasten nach 72 Stunden auf (A) beschichteten Zellkulturplatten und (B) in Kontakt mit PCL-Faserfragmenten.

### 3.3.3 Zeitliche Entwicklung der Interaktion von Tumorzellen mit PCL-Faserfragmenten

Zur Untersuchung der zeitlichen Entwicklung der Zell-Faser-Interaktion werden Melanomzellen mit FUCCI (fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator) Modifikation verwendet und über einen Zeitraum von 3 Tagen alle 17 Minuten fotografiert. Die Zellen werden, wie in Abschnitt 2.2.14 beschrieben, auf beschichteten Zellkulturplatten kultiviert. So können sie wahlweise mit einer attraktiven planaren Oberfläche oder mit der Morphologie der PCL-Faserfragmente interagieren. Ausschnitte aus den dabei entstandenen Zeitraffervideos wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Neurobiologie des Universitätsklinikums Würzburg erstellt und sind in Abbildung 3.39 und Abbildung 3.40 dargestellt.

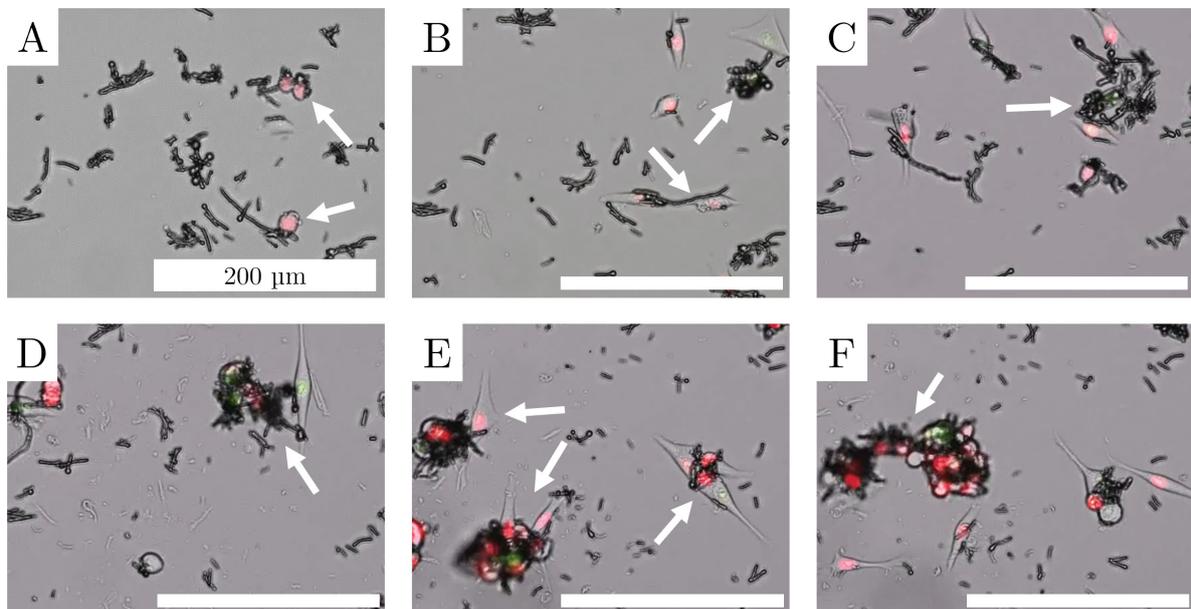


**Abbildung 3.39:** Repräsentative Fluoreszenz-Zeitrafferaufnahmen der Interaktion von FUCCI-Tumorzellen mit PCL-Faserfragmenten. Die Aufnahmezeitpunkte sind in jedem Bild angegeben. Grüne Zellen befinden sich in der Ruhephase, rot fluoreszierende Zellen in der Proliferationsphase. Nach 12 Stunden wurde die Belichtung korrigiert, daher weicht die Aufnahme bei Stunde 0 farblich von den anderen ab.

In Abbildung 3.39 ist zu Beginn eine gleichmäßige Verteilung einzelner Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusstadien zu erkennen. Im Verlauf der untersuchten 72 Stunden

kommt es zu einer Anheftung der einzelnen Zellen an PCL-Faserfragmente und zur Bildung erster kleiner Aggregate aus wenigen Zellen an mehreren Fasern. Diese Zellaggregate wachsen und wandern im Medium, nehmen weitere Faserfragmente auf und fusionieren bei Kontakt mit anderen zellbeladenen Aggregaten. Durch diese Form der Selbstassemblierung nimmt die Anzahl der beobachtbaren Zellaggregate mit der Zeit stetig ab, die verbleibenden nehmen jedoch deutlich an Größe zu. Am Ende des Experiments sind nur noch wenige sehr große Aggregate mit bis zu 100 Zellen pro Aggregat vorhanden.

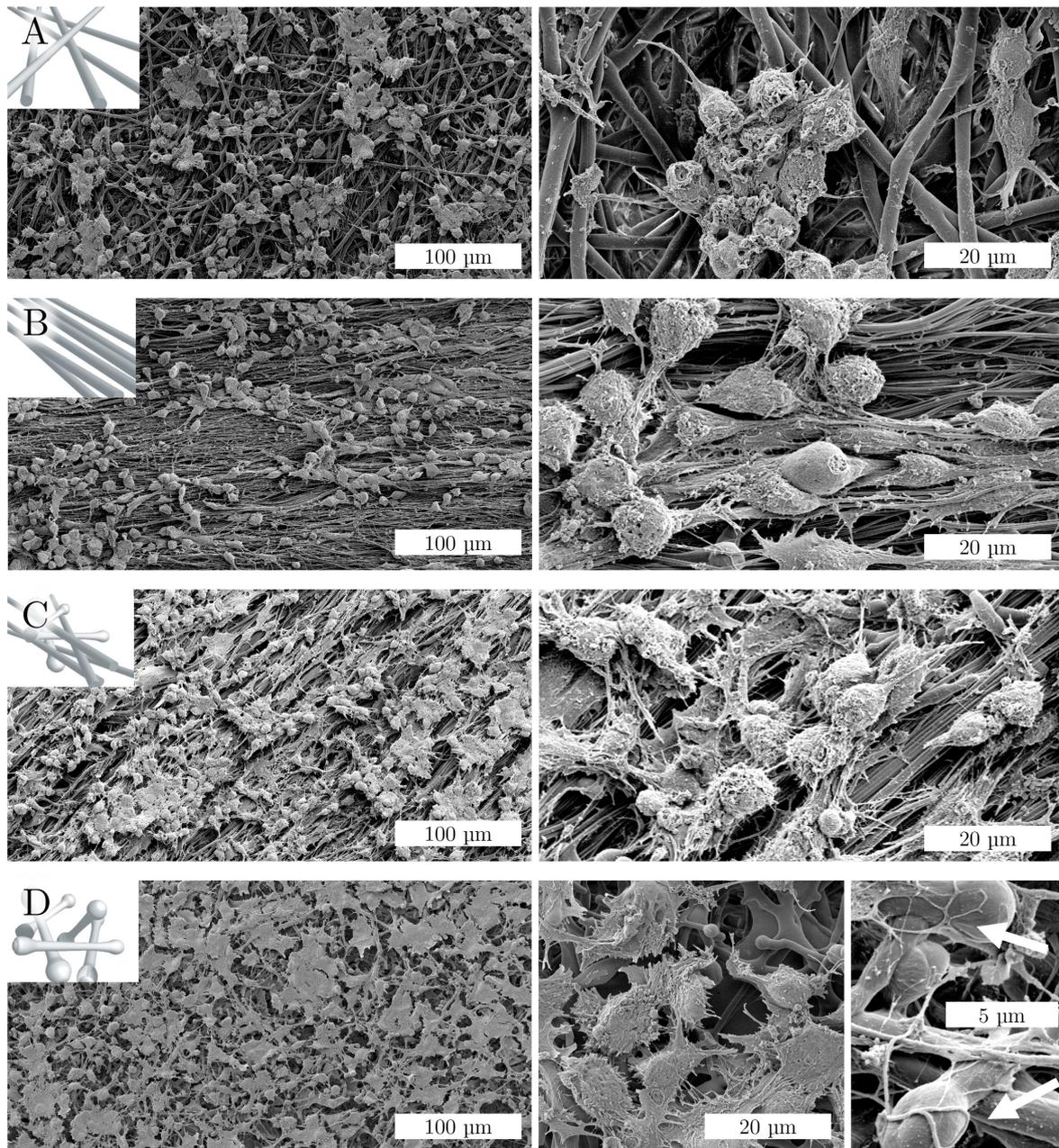
Eine detaillierte Betrachtung des Verhaltens einzelner Zellen ist in Abbildung 3.40 möglich. Auch hier sind zu Beginn des Versuchs nur sehr wenige Zellen zu erkennen, die sich vorwiegend in der Nähe der Faserfragmente befinden. In den ersten Stunden kann beobachtet werden, wie einzelne Zellen auf die Oberfläche der Zellkulturschale wandern und dabei Fasern aufnehmen mit denen sie in Kontakt kommen. Im Laufe von 36 Stunden bilden sich Cluster aus Zellen und Fasern, die kontinuierlich weitere Zellen aufnehmen. In der Umgebung der Cluster kann nun eine verstärkte Zellkontraktion und ein vermehrter Übergang in die Proliferationsphase beobachtet werden. Immer wieder verlassen einzelne Zellen das Cluster und interagieren mit weiteren Fragmenten. Es folgen wiederholte Fusionen von Clustern und damit eine Zunahme der Anzahl von Zellen und Fragmenten pro Cluster.



**Abbildung 3.40:** Repräsentative Fluoreszenz-Zeitrafferaufnahmen der Interaktion von FUCCL-Reporterzellen mit PCL-Faserfragmenten. Die Entwicklung von (F) Aggregaten aus Zellen und Faserfragmenten kann von (A) Beginn des Experiments über die Zwischenschritte (B) erste Zell-Faser-Interaktion, (C) Kontraktion der Zellen und (D&E) Austritt einzelner Zellen aus dem Aggregat beobachtet werden.

### 3.3.4 Zell-Interaktion mit PCL-Faserfragmenten unterschiedlicher Morphologie

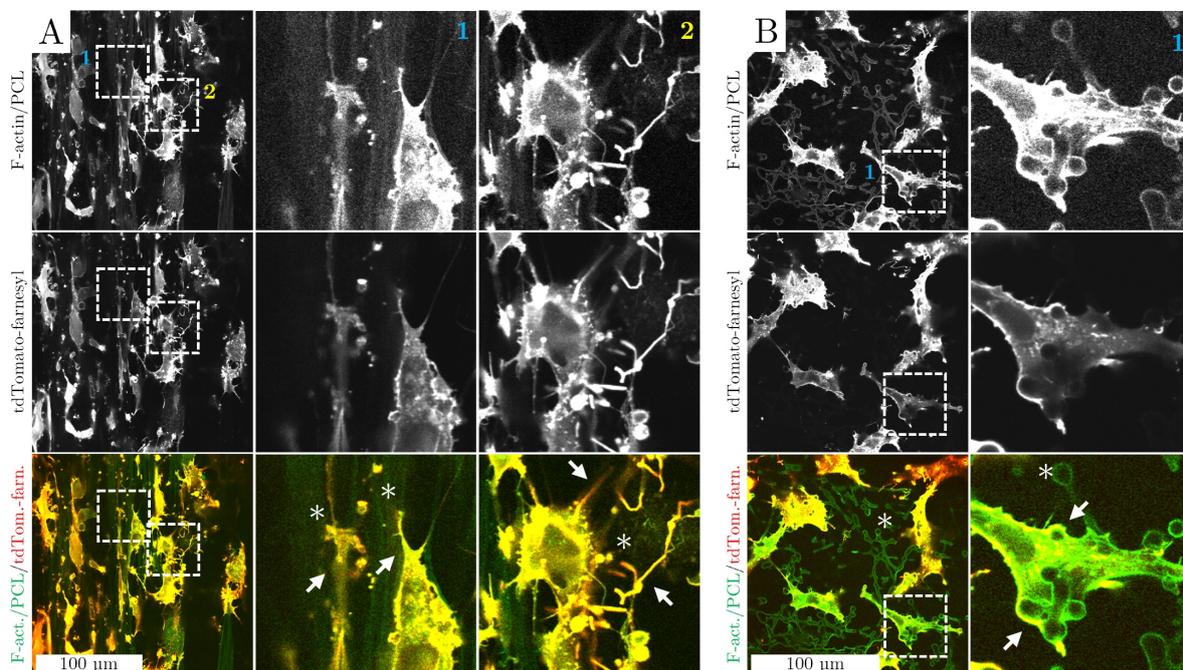
Um den Einfluss der Morphologie der PCL-Fasern auf die Zellinteraktion zu untersuchen, werden verschiedene Vliese gemäß Abschnitt 2.2.14 mit U87-Glioblastomzellen besiedelt und anschließend mittels REM morphologisch charakterisiert (Abb. 3.41).



**Abbildung 3.41:** Repräsentative REM-Analysen von kollagenbeschichteten elektrogewebenen Vliesen nach Kultivierung von U87-Reporterzellen auf der Oberfläche. Die untersuchten Morphologien sind (A) zufällig angeordnete Endlosfasern, (B) ausgerichtete Endlosfasern, (C) ausgerichtete Fasern und Fragmente und (D) zufällig angeordnete Fragmente.

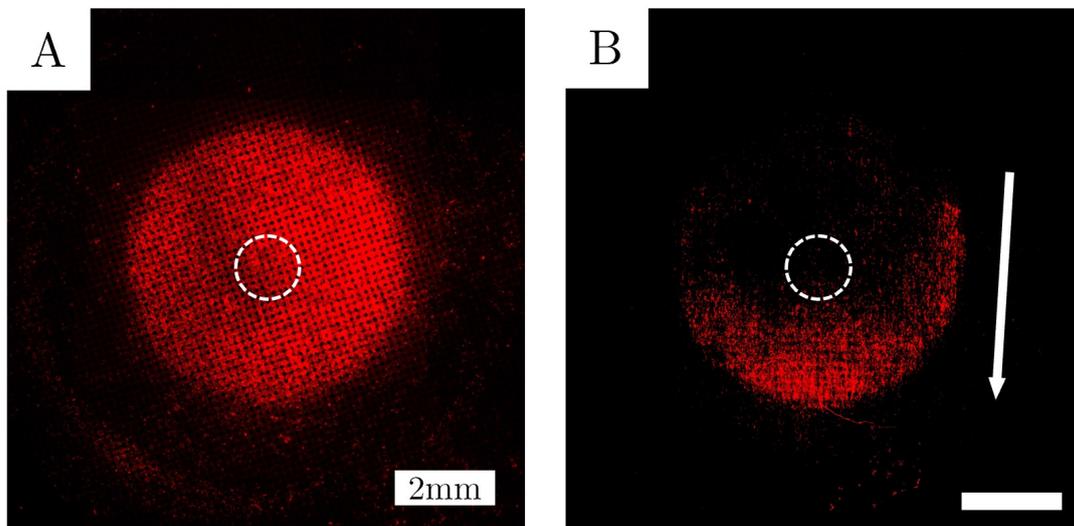
Die REM-Analyse zeigt Unterschiede in der Zellmorphologie auf den untersuchten Vliesen. Zellen, die auf der Oberfläche von zufällig angeordneten Endlofasern (A) kultiviert wurden, zeigen überwiegend Clusterwachstum und eine geringe Tendenz, auf der Faseroberfläche zu spreiten. Die Kultivierung auf ausgerichteten Endlofasern (B) zeigt ein ähnliches Bild von Clusterbildung und geringem Spreitverhalten, jedoch sind die Zellcluster bereits deutlich entlang der Hauptausrichtungsachse der Fasern orientiert. Auf gemischten Vliesen aus Endlofasern und Faserfragmenten (C) spreiten die Zellen erstmals deutlich auf der Faseroberfläche und wachsen gleichzeitig homogener über die gesamte Probenoberfläche. Die homogenste Besiedlung der Oberfläche ist bei Proben aus reinen Fragmenten (D) zu beobachten. Hier ist ein Großteil der Oberfläche gleichmäßig besiedelt und die Zellen spreiten deutlich bei Interaktion mit der Oberfläche.

Für eine genauere Analyse der Zell-Faser-Interaktion, insbesondere der Integrin-Bindung an die kollagenbeschichtete Oberfläche, wird eine F-Actin-Färbung durchgeführt und im konfokalen Fluoreszenzmikroskop beobachtet (Abb. 3.42), wie im Abschnitt 2.2.14 erläutert. Dazu werden lentiviral modifizierte U87-Reporterzellen verwendet, die eine stabile Expression des rot fluoreszierenden tdTomato Proteins aufweisen. Aufgrund des integrierten membranlokalisierenden Farnesylationssignals ist in diesen Zellen die gesamte Membran rot fluoreszierend.



**Abbildung 3.42:** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der U87-Reporterzellen auf (A) gemischter Morphologie aus PCL-Fasern und Fragmenten und (B) nur auf Fragmenten. Die F-actin Färbung ist in in den Aufnahmen grün dargestellt, tdTomatoe-farnesyl in rot.

U87-Reporterzellen werden auf Proben mit gemischten Anteilen an kontinuierlichen Fasern und Fragmenten sowie auf reinen Fragmenten kultiviert, anschließend gemäß Abschnitt 2.2.14 fixiert und das Actin-Zytoskelett mit dem Antikörper Alexa488-Phalloidin angefärbt. Die F-Actin-Färbung gibt Aufschluss über die Morphologie der adhärenierten Zellen, da sie durch den Kontakt der Integrin-Adhäsionsrezeptoren mit der Kollagenoberfläche aktiviert wird. Abbildung 3.42 zeigt die Kombination der Ergebnisse der F-Actin-Färbung und der rot fluoreszierenden Membran. Dies ermöglicht die Unterscheidung verschiedener Zellmorphologien aufgrund der unterschiedlichen Anzahl von Kontaktpunkten mit Kollagen. U87-Reporterzellen, die in gemischten Proben in Bereichen mit Endlofasern gezüchtet wurden, zeigen eine runde Morphologie und multiple, schwache filopodiale Protrusionen, was zu einer eingeschränkten Zell-Kollagen-Faser-Adhäsion führt. In der gleichen Probe sind die U87-Reporterzellen in Regionen mit Faserfragmenten deutlich verlängert und F-Actin-stabilisierte Protrusionen entlang der PCL-Fragmente sind nachweisbar. Dieser Effekt ist noch ausgeprägter in Proben mit reinen Faserfragmenten, wo das ausgeprägteste Proliferationsverhalten beobachtet wird. Vielfältige Interaktionen zwischen Zellen und den abgerundeten Enden der Fragmente finden statt, was durch die starke Intensität der F-Actin-Fluoreszenz in diesen Bereichen verdeutlicht wird. Der bereits beschriebene Effekt der Ausrichtung der Zellen an der Faserachse kann zusätzlich in einem größeren Maßstab in Abbildung 3.43 nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.43:** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von U87-Reporterzellen auf elektrogewebenen Vliesen aus PCL-Fragmenten in (A) zufälliger Anordnung und (B) axialer Ausrichtung. Die gestrichelten Kreise markieren den Bereich, in dem die Zellen zum Zeitpunkt  $t=0s$  positioniert waren. Der weiße Pfeil markiert die Hauptachse der Fragmentorientierung in Probe B.

Dazu werden U87-Reporterzellen in einem Zylinder mit 5 mm Radius auf die Oberfläche eines Vlieses mit ungeordneten Fragmenten und auf ein Vlies mit stark ausgerichteten

Fragmenten ausgebracht. Bei der Probe ohne Ausrichtung der Fragmente besiedeln die U87-Reporterzellen innerhalb von 72 Stunden homogen den größten Teil der Oberfläche in alle Richtungen. Bei den ausgerichteten Faserfragmenten findet nicht nur ein gerichtetes Wachstum, sondern auch eine Migration der kultivierten Zellen statt, da im Bereich der ursprünglichen Ansiedlung nur noch vereinzelt Zellen zu finden sind. Bemerkenswert ist hier zusätzlich, dass die Bewegung der Zellen überwiegend nur in einer Richtung entlang der Faserachse stattfindet und in der entgegengesetzten Richtung (180 Grad dazu) kaum Zellen nachweisbar sind.

Zusammenfassend stellt die Entwicklung von Faserfragmenten aus PCL in Kombination mit einer Biofunktionalisierung durch Kollagen eine vielversprechende Strategie zur Kontrolle der Zelladhäsion und -migration in Hydrogelen dar. Insbesondere die Ausbildung fokaler Adhäsionen und die verstärkte Integrinbindung auf hantelförmigen PCL-Mikrofasern zeigen ein großes Potenzial für zukünftige Anwendungen in der Geweberegeneration. Allerdings sind mit der Integration dieser Fasern in die 3D-Drucktechnologie noch offene Fragen und Herausforderungen verbunden. In den folgenden Abschnitten soll daher auf diese Aspekte näher eingegangen werden.

# Kapitel 4

## Diskussion

Faserfragmente sind als Additive in der Entwicklung von Biotinten von besonderem Interesse, da sie sowohl die mechanischen Eigenschaften der Hydrogelmatrix während und nach dem Druck verbessern können, als auch die Integration einer zusätzlichen anisotropen Hierarchieebene für die biologische Interaktion mit Zellen ermöglichen. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zum Einfluss von PCL-Faserfragmenten auf die Druckeigenschaften von Hydrogelen und die Zell-Faser-Interaktion werden in den folgenden Kapiteln diskutiert und in drei Teilbereichen dargestellt.

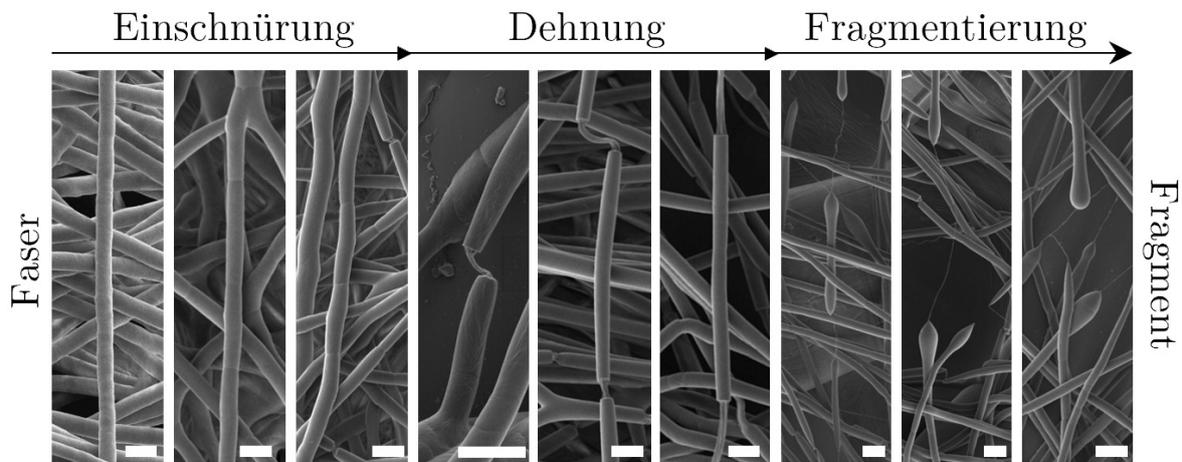
Der erste Abschnitt beschäftigt sich mit dem Phänomen der *in situ* Herstellung der hantelförmigen PCL-Faserfragmente während des Elektrospinprozesses und vergleicht diesen mit dem Schmelz-Elektro-Schreibverfahren.

Im zweiten Teil wird der Einfluss dieser PCL-Faserfragmente auf die rheologischen und in der Praxis ermittelten Druckeigenschaften der Hydrogele Pluronic, Alginate und rekombinantem Spinnenseidenprotein näher beleuchtet. Mit Hilfe des integrierten Burgers-Modells werden die Zusammenhänge aus den rheologischen Messungen mathematisch abgebildet und korreliert. Um daraus praxisrelevante Aussagen ableiten zu können, wird ein Versuchsaufbau zur Messung des Strangfließens nach dem Druck konzipiert und die Ergebnisse mit Hilfe eines neu entwickelten Ansatzes modelliert. Aus diesen beiden Ansätzen wird ein Modell zur Vorhersage des Druckverhaltens unterschiedlicher Hydrogele aus leicht zugänglichen rheologischen Daten entwickelt.

Der letzte Teil gibt einen Überblick über die gesammelten Erfahrungen der Zell-Faser-Interaktion aus den durchgeführten Zellkulturversuchen und präsentiert ein Modell zur Erklärung des beobachteten Zellverhaltens auf Fasern unterschiedlicher Morphologie.

## 4.1 Herstellung hantelförmiger PCL-Fragmente

Der erste Teil der Diskussion beschäftigt sich mit der Entstehung der hantelförmigen Faserfragmente aus Polycaprolacton, zunächst aus der Lösung und anschließend aus der Schmelze, jeweils unter Verwendung eines Hochspannungsfeldes. Abbildung 4.1 gibt eine Übersicht über die unterschiedlichen Morphologien von elektrogewonnenem PCL aus HFIP innerhalb des hier beschriebenen Prozessfensters. Die Bandbreite an Übergangszuständen von der Faser bis zum Fragment veranschaulicht die Komplexität des im Folgenden beschriebenen Fragmentierungsmechanismus.

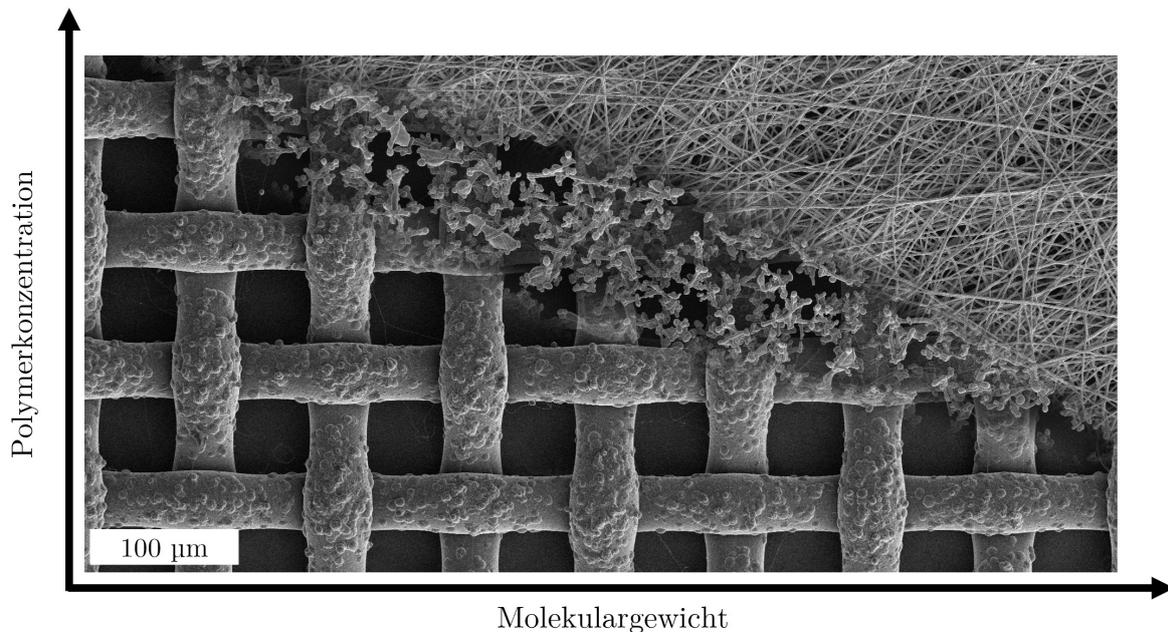


**Abbildung 4.1:** REM-Analyse einzelner repräsentativer Übergangszustände zwischen Faser und Fragment aus PCL im elektrostatischen Faserspinnen aus Lösung. Der abgebildete Maßstabsbalken entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

Trotz einer Vielzahl von Publikationen, die sich mit der Faserherstellung aus Polycaprolacton in verschiedenen Lösungsmitteln beschäftigen, wurde diese spezielle Morphologie bisher in Übersichtsarbeiten [134–137] nicht erwähnt. Während sich die meisten Studien mit der Optimierung einzelner Spinnparameter wie Volumenstrom [138, 139], Spannungs-/Abstandsverhältnis [139–142], Dielektrizitätskonstante [143], Luftfeuchte [144] oder Temperatur [145] beschäftigen, gibt es kaum systematische Untersuchungen im Grenzbereich zwischen Elektrosprühen und Elektrosponnen für diese Materialsysteme.

Zu erklären ist dieser Umstand zum einen dadurch, dass sich deutlich mehr Forscher für die Herstellung von kontinuierlichen Fasern interessieren und zum anderen durch das kleine Prozessfenster in dem die hier beschriebene Fragmentierung auftritt. Die Wahrscheinlichkeit zufällig auf diesen Effekt zu stoßen, ist damit gering. Einzig Enis et al. [146] präsentieren in ihrer Studie ähnliche Morphologien. Diese werden aber nur als ungewollte Spinnartefakte und unvollständige Fasern bezeichnet und weder näher charakterisiert noch versucht deren Entstehung zu erklären.

Die bereits vorgestellten Ergebnisse aus Abschnitt 3.1.1 zeigen, dass diese spezielle Morphologie der hantelförmigen Faserfragmente nur in einem sensiblen Grenzbereich des Elektrospinsens auftritt. Kleinere Variationen eines oder mehrerer Parameter führen dabei entweder zu einem Elektrosprühprozess, bei dem gleichmäßige Kugeln im Mikrometerbereich erzeugt werden, oder zur Herstellung eines stabilen Vlieses aus kontinuierlichen Fasern (Abb. 4.2).



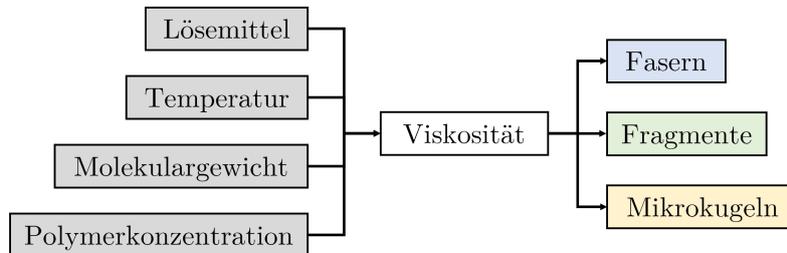
**Abbildung 4.2:** Retuschierte Darstellung der entstehenden Morphologien in Abhängigkeit des Molekulargewichts des verwendeten PCL und der Polymerkonzentration in der Spinnlösung auf dem Kollektornetz. In einem kleinen Prozessfenster können Faserfragmente hergestellt werden. Eine Variation der Prozessparameter führt zu Mikrokugeln oder kontinuierlichen Fasern.

Für ein umfassendes Verständnis der auftretenden Effekte werden zunächst die maßgeblich beteiligten Einflussfaktoren beschrieben und deren Abhängigkeit voneinander definiert.

#### 4.1.1 Rheologische Voraussetzungen

Aus den Vergleichen der rheologischen Untersuchungen der Spinnlösungen und der daraus resultierenden Morphologien in Abschnitt 3.1.2 wird deutlich, dass die Viskosität der verwendeten Spinnlösung eine entscheidende, aber nicht die einzige Rolle für die Fasermorphologie spielt. So können Lösungen mit gleicher Viskosität zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Hier sind die bekannten Faktoren Polymerkonzentration und Molekulargewicht des verwendeten Polymers, sowie die Wahl des Lösungsmittels und die Temperatur der Lösung die größten Einflussfaktoren (Abbildung 4.3).[147] Da alle Spinnlösungen in die-

ser Arbeit mit dem gleichen Lösungsmittel (Hexafluorisopropanol) hergestellt wurden und sich alle Lösungen zum Zeitpunkt des Spinnens unter kontrollierten Raumbedingungen befanden, können diese beiden Punkte im direkten Vergleich der Lösungen vernachlässigt werden. Die Abhängigkeit der Viskosität von der Polymerkonzentration wurde bereits in den 50er und 60er Jahren des 20. Jahrhunderts von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben [148–150] und kann auch durch die Ergebnisse aus Abschnitt 3.1.1 bestätigt werden.

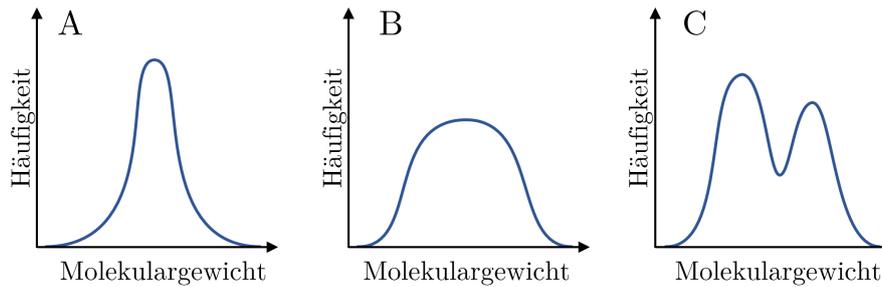


**Abbildung 4.3:** Schematische Darstellung der einstellbaren Parameter, die die Viskosität der Spinnlösung und die hergestellten Morphologien beeinflussen.

Eine Erhöhung der Polymerkonzentration an PCL führt daher zu einer Erhöhung der Viskosität der Spinnlösung (Abb. 3.6). Dieser Zusammenhang kann dadurch erklärt werden, dass die Anzahl der Polymerketten bei gleichem Volumen zunimmt, wodurch sich die Abstände zwischen den einzelnen Ketten in Lösung verringern und die Wahrscheinlichkeit von Wechselwirkungen in Form der Bildung von Kettenverknäuelungen zunimmt.[151] Diese Verschlaufungen erhöhen den inneren Fließwiderstand der Lösung, da die physikalischen Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten erst aufgebrochen werden müssen, bevor eine Relativbewegung der Ketten zueinander stattfinden kann.[123]

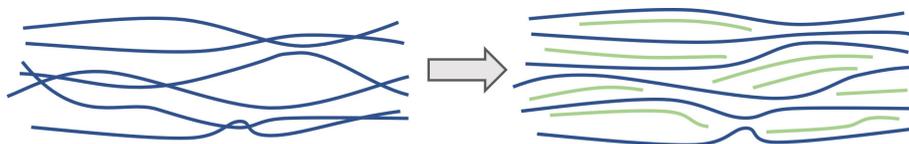
Der zweite wichtige Faktor neben der Konzentration ist, wie bereits erwähnt, das Molekulargewicht des verwendeten Polymers. Hier können ähnliche Effekte wie bei der Konzentration beobachtet werden. Bei wenig verzweigten Polymeren wie Polycaprolacton kann das Molekulargewicht als Maß für die Kettenlänge der einzelnen Polymerketten angesehen werden. Auch hier führt eine Erhöhung des Molekulargewichts zu einer Erhöhung der Viskosität. Nach Peacock et al. [147] steigt mit zunehmender Kettenlänge die Wahrscheinlichkeit, dass sich benachbarte Ketten überlappen, wodurch die Anzahl der möglichen Kettenverschlaufungen zunimmt und der innere Fließwiderstand der Lösung steigt.

Bei der Betrachtung des Molekulargewichts muss die tatsächlich vorliegende Kettenlängenverteilung berücksichtigt werden (Abb. 4.4). Bei polydispersen Systemen wird in der Regel anstelle des Molekulargewichts das gewichtsmittlere Molekulargewicht verwendet, um dieser Tatsache Rechnung zu tragen.[152] Der sogenannte Polydispersitätsindex wird aus dem Verhältnis von gewichtsmittlerem Molekulargewicht zu zahlenmittlerem Molekulargewicht gebildet und gibt einen Hinweis auf die Breite der jeweiligen Verteilung.



**Abbildung 4.4:** Schematische Darstellung möglicher Kettenlängenverteilungen in drei Polymeren mit gleichem gewichtsmittleren Molekulargewicht. Die Verteilungen werden als (A) monodispers/monomodal eng, (B) monodispers/monomodal breit und (C) polydispers oder bimodal klassifiziert.

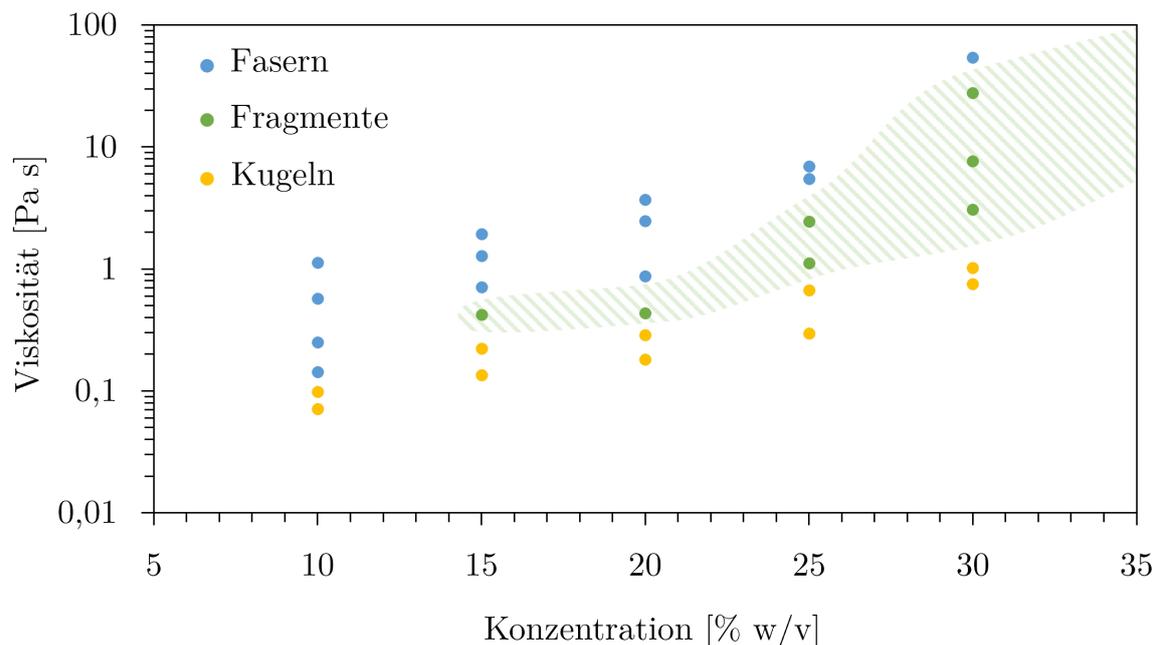
Je nach Art der Verteilung wurden bereits von Sifri et al. [153] verschiedene weitere Eigenschaften beschrieben. So sind Polymere mit einer klar definierten, sehr engen Verteilung (Abb. 4.4-A) nach Ye et al. [154] generell schwieriger zu verarbeiten und zeigen eine geringe Kettenorientierung, dafür aber eine hohe Schlagzähigkeit gegenüber einer breiten Verteilung (Abb. 4.4-B). Polymere mit einer bimodalen Verteilung der Kettenlängen (Abb. 4.4-C) sind dagegen einfacher zu verarbeiten und weisen eine stärkere Orientierung und damit ein stark anisotropes Verhalten auf.[155] Der Anteil der kurzen Ketten wirkt in Lösung als Weichmacher und erhöht die Elastizität des Polymers, die langen Ketten ermöglichen die Faserbildung bei geringeren Konzentrationen. Längere Ketten zeigen deutlich höhere Relaxationszeiten und tragen wesentlich zum Kriechverhalten des Polymers bei.[156] Untersuchungen von Ye et. al. an monodispersen Polymeren im Vergleich zu Mischungen mit höherem Polydispersitätsindex zeigen weitere Vorteile für das Elektrosplennen durch den Plastifizierungseffekt (Abb. 4.5).[154] So steigen bei polydispersen Systemen die Dehnviskosität und die Kaltverfestigung deutlich an, zudem ist ein abgestuftes und breiteres Relaxationsspektrum zu beobachten.[154, 157]



**Abbildung 4.5:** Schematische Darstellung des Plastifizierungseffekts. In einem monodispersen System (linke Seite) mit langkettigen Polymeren treten viele Verschlaufungen auf. Die Zugabe des gleichen Polymers mit kurzen Ketten (rechte Seite) kann die Flexibilität des Polymersystems erhöhen, da sich die kurzen Ketten in die Zwischenräume einlagern.

Dieses Verhalten konnte in dieser Arbeit durch die Untersuchungen der polydispersen Mischungen von Polycaprolacton aus hoch- und niedermolekularem Polymer (Mischung aus 10 kDa und 80 kDa PCL) im Vergleich zum monodispersen System (45 kDa PCL)

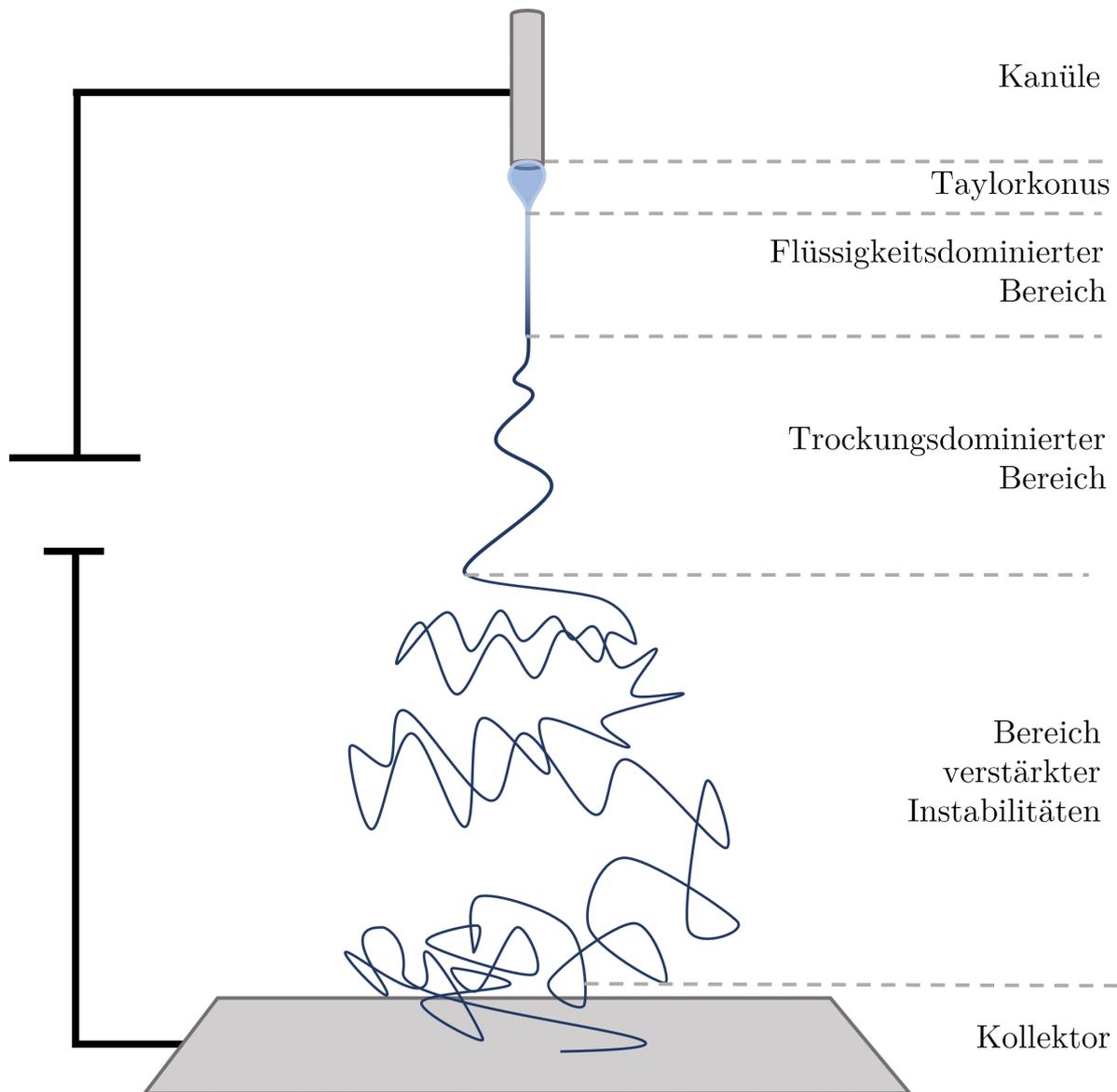
in Abschnitt 3.1.1 bestätigt werden. Bei den Mischungen steht aufgrund der höheren Elastizität und des Plastifizierungseffektes ein breiteres Prozessfenster zur Verfügung, in dem Fragmente hergestellt werden können (markierter Bereich in Abbildung 4.6), die zudem eine größere Spanne in den möglichen erreichbaren Aspektverhältnissen aufweisen. Der Effekt des Einbringens kürzerer Ketten als Weichmacher stößt jedoch dort an seine Grenzen, wo durch eine hohe Anzahl kurzer Ketten die Dichte der Kettenschlaufen so stark reduziert wird, dass keine stabile Faserbildung mehr stattfinden kann (keine Fasern mehr bei Mischungen PCL10:PCL80 von 9:1 und 10:0) und in den von Shenoy et. al. beschriebenen Elektrospray-Prozess übergeht.[156]



**Abbildung 4.6:** Vergleich der Viskosität von Spinnlösungen bei einer Scherrate von  $10 \text{ s}^{-1}$  und der erzeugten Morphologie von (gelb) Kugeln, (grün) Fragmenten und (blau) Fasern. Die schraffierte Fläche zeigt den Bereich, in dem Fragmente erzeugt werden können.

#### 4.1.2 Faserfragmentierung im elektrostatischen Spinnprozess

Neben den bereits beschriebenen Eigenschaften des Ausgangsmaterials spielen weitere Einflussfaktoren während der Verarbeitung eine entscheidende Rolle für die Ausprägung der letztendlich erzeugten Morphologie. Dabei stehen die einzelnen Prozessparameter oft in direkter Abhängigkeit zueinander, beeinflussen sich gegenseitig oder wirken in kritischen Gleichgewichtszuständen als Gegenspieler. Um zu verstehen, in welchem Prozessfenster die beobachteten hantelförmigen Fragmente entstehen, wird im Folgenden der Elektrosprinnprozess (Abb. 4.7) schrittweise hinsichtlich des Potenzials zum Abreißen oder Aufspalten des Polymerstrahls im elektrischen Feld betrachtet.

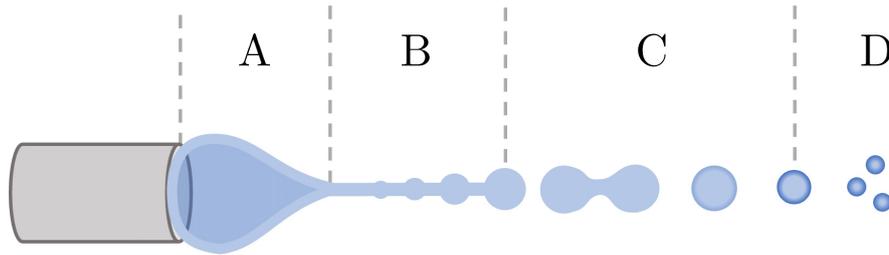


**Abbildung 4.7:** Schematische Darstellung des Elektrospleinprozesses, unterteilt in Bereiche, in denen potenziell Faserfragmentierung auftreten kann.

### Taylorkonus

Die erste Möglichkeit zur Fragmentierung bietet sich unmittelbar nach der Ausbildung des Taylorkonus, in einem Bereich, in dem die Fließeigenschaften der Polymerlösung dominieren (Abb. 4.8). In diesem Bereich ist die Konzentration der elektrischen Ladungen an der Oberfläche bereits hoch genug, um den Polymerstrahl in Richtung Kollektor zu beschleunigen und zu einer Dehnung des überwiegend flüssigen Strahls zu führen (Abb. 4.8-A). Wie bereits von Rayleigh und Plateau beschrieben und für eine Vielzahl von Materialien und Prozessen untersucht, kommt es infolge der Krafteinwirkung zur Ausbildung von Rayleigh-Plateau-Instabilitäten (Abb. 4.8-B), einer durch Kapillarkräfte hervorgerufenen

Instabilität flüssiger zylindrischer Körper. [158–161] Ist an diesem Punkt die Dichte der internen Verschlaufungen der Polymerketten nicht groß genug, kommt es zum Abreißen des Flüssigkeitsstrahls (Abb. 4.8-C).[156] Die resultierende Morphologie dieser Übergangszustände zeigt durch ihre verbleibenden zylindrischen Bereiche mit abgerundeten Enden große Ähnlichkeit zu den hier vorgestellten PCL-Faserfragmenten.[162, 163] Aufgrund der Dynamik des oberflächenspannungsinduzierten Prozesses zur Minimierung der Oberflächenenergie ist diese Morphologie jedoch nicht stabil, sondern kontrahiert unmittelbar nach ihrer Entstehung zu Mikrokugeln.



**Abbildung 4.8:** Schematische Betrachtung des Polymerstrahls im Bereich (A) des Taylorkonus, (B) des Auftretens von Rayleigh-Plateau-Instabilitäten, (C) der Bildung von Übergangszuständen und Kugeln und (D) der Wiederaufspaltung der Polymertropfen.

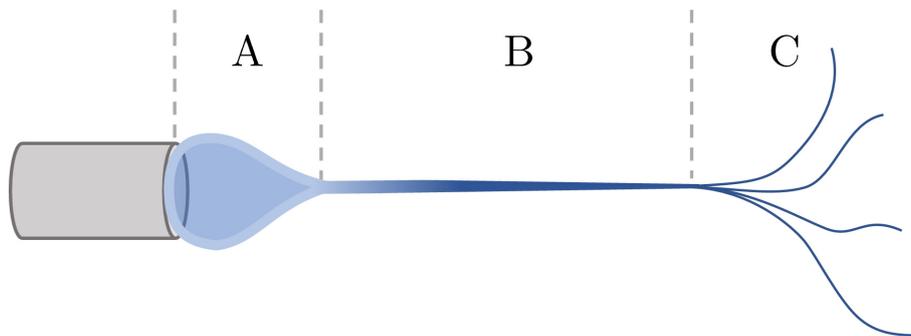
Um den Übergangszustand (Abb. 4.8-C) zu erhalten, müsste das Lösungsmittel an dieser Stelle sofort verdampfen, was bei einem zu erwartenden Strahldurchmesser von mehr als  $50\ \mu\text{m}$  (Kanüledurchmesser  $800\ \mu\text{m}$ ) an dieser Stelle aufgrund der Diffusionslimitierung nach Wu et al. nicht plausibel ist.[164] Die erzeugten Tropfen sind nun im elektrischen Feld voneinander isoliert und können somit keine Ladungen mehr austauschen. Beginnt nun das Lösungsmittel zu verdampfen, verkleinert sich die Oberfläche des Tropfens, was zu einer Erhöhung der elektrischen Ladungsdichte auf der Tropfenoberfläche führt. Dies bewirkt eine weitere Instabilisierung des Tropfens. Gleichzeitig treten auch stabilisierende Effekte durch das Verdampfen des Lösungsmittels auf. Da das Lösungsmittel an der Grenzfläche zwischen Tropfen und Umgebungsluft verdampft, bildet sich, wie von Wilhelm et al. beschrieben, an dieser Grenzfläche eine erhöhte Polymerkonzentration aus.[165] Zusätzlich wird der Tropfenoberfläche durch die Verdunstungsenthalpie Wärmeenergie entzogen.

Beide Effekte, die Erhöhung der Polymerkonzentration und die Verringerung der Temperatur, führen zu einer Erhöhung der Viskosität an der Tropfenoberfläche. Dadurch wird zum einen die Kontraktion des Tropfens verlangsamt, was den Anstieg der Ladungsdichte begrenzt, und zum anderen die Oberflächenspannung im Material erhöht, was nach Zhang et al. die Wahrscheinlichkeit einer weiteren Zerteilung des Tropfens verringert. [166] Steigt die Ladungsdichte an der Oberfläche schneller als die Stabilisierung voranschreitet, entweder durch ein stärkeres elektrisches Feld (Ladungsdichte) oder durch ein langsam verdampfendes Lösungsmittel (langsamere Stabilisierung), so kann der Tropfen infolge einer

Coulomb-Explosion in kleinere Tropfen aufbrechen (Abb. 4.8-D). Diese haben zunächst zusammengenommen das gleiche Volumen wie zuvor, nun aber eine vergrößerte Oberfläche, auf der sich die Ladungen gleichmäßig verteilen können. Dieser Vorgang wiederholt sich so lange, bis die Oberflächenspannung größer ist als die abstoßenden Kräfte der Oberflächenladungen. Anschließend stabilisiert sich der Tropfen, wie von Morais et al. beschrieben, und das restliche Lösungsmittel kann auf dem Weg zum Kollektor verdampfen.[167]

## Jet-Splitting

Ist die Viskosität des Strahls und der innere Verschlaufungsgrad nach dem Taylorkonus hoch genug, um den Rayleigh-Instabilitäten zu widerstehen, bildet sich ein zunächst stabiler Polymerlösungsstrahl. Im beschriebenen ersten Bereich dominieren die Fließeigenschaften das Verhalten des Polymerlösungsstrahls. Durch Dehnung der Faser und Verdampfung des Lösungsmittels wird nachfolgend ein Übergangszustand erreicht, in dem die Trocknungseffekte einen stärkeren Einfluss ausüben. An diesem Übergang (Abb. 4.9) besteht nach Schubert die Möglichkeit des Jet-Splittings.[168] In Abhängigkeit von der Konzentration und der Viskosität der Spinnlösung an dem beschriebenen Übergangszustand kann es in seinem Modell zu einer Aufspaltung des Polymerlösungsstrahls in eine Vielzahl von Einzelstrahlen kommen. Die Anzahl kann durch Analyse der Durchmesser-Verteilung des resultierenden elektrogewebenen Vlieses und anschließender Anwendung der von ihm vorgeschlagenen Skalierungsgesetze bestimmt werden.



**Abbildung 4.9:** Schematische Darstellung des Jet-Splittings eines Polymerstrahls im Bereich (A) des Taylorkonus, (B) flüssigkeitsdominierten Verhaltens und (C) des Übergangs zum Trocknungsdominierten Bereich, in dem die Aufspaltung des Polymerstrahls stattfindet.

Die Dehnung der entstehenden Faser im ersten Bereich erhöht die Ladungskonzentration an der Oberfläche (Abb. 4.9-B). Beim Jet-Splitting wird die Oberflächenspannung durch die Dehnung der Faser überschritten, was zu einer Aufspaltung des Polymerstrahls in mehrere Fasern mit kleinerem Durchmesser führt (Abb. 4.9-C). Die Aufspaltung führt nach Schubert zu einer Vergrößerung der freien Oberfläche und damit zu einer Verringerung

der Ladungsdichte.[168] Durch den geringeren Durchmesser der entstehenden Fasern kann das Lösungsmittel schneller verdampfen und es werden vollständig getrocknete Fasern auf dem Kollektor abgelegt.

## Sprödbbruch

Ist die Faser stabil genug um den kritischen Übergang vom flüssigkeitsdominierten zum trocknungsdominierten Verhalten ohne Fragmentierung und Jet-Splitting zu überstehen, geht sie in den Bereich über, der allein von Trocknungseffekten dominiert wird. In diesem Bereich wird der Durchmesser hauptsächlich durch die Verdampfung des Lösungsmittels weiter reduziert, bis schließlich der Enddurchmesser im vollständig getrockneten Zustand erreicht ist. Die nun auftretenden Instabilitäten der Faser, hervorgerufen durch die Abstößungskräfte der elektrischen Ladungen an der Oberfläche, verursachen nach Reneker et al. in diesem Bereich hohe Biegespannungen.[113] Diese Spannungen führen zu einer starken Dehnung der entstehenden Faser und zu einer Ausrichtung der Polymerketten in Lösung. Bei Materialien mit geringer Elastizität kann es daher in diesem Bereich zum Sprödbbruch der Faser kommen (Abb. 4.10), wobei Faserfragmente mit scharfen Bruchkanten entstehen.



**Abbildung 4.10:** Schematische Darstellung des Polymerstrahls beim Sprödbbruch. Im trocknungsdominierten Bereich erzeugen die Biegeinstabilitäten aufgrund der elektrischen Ladung an der Oberfläche hohe Scherkräfte, die bei ungenügender Faserelastizität zum Sprödbbruch führen.

Bei näherer Betrachtung stimmt keiner der vorgestellten Mechanismen vollständig mit den in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen aus Abschnitt 3.1 überein. Die hier beschriebenen Faserfragmente haben eine hantelförmige Morphologie mit verdickten und abgerundeten Enden, was gegen einen Sprödbbruch spricht. Die erzeugten Fragmente zeigen keine bi- oder multimodalen Durchmesserverteilungen, die durch ein Jet-Splitting erzeugt werden, sondern eine monomodale Durchmesserverteilung mit einem Maximum bei 3-5 Mikrometern (je nach Polymerkonzentration) und einer geringen Standardabweichung von weniger als  $0,5 \mu\text{m}$ . Gegen eine Bildung direkt nach dem Taylorkonus sprechen schließlich die Beobachtungen, dass auf einem ebenen Kollektor zunächst Endlosfasern abgelegt werden und benachbarte Fragmente axial ausgerichtet auf dem Kollektor liegen. In

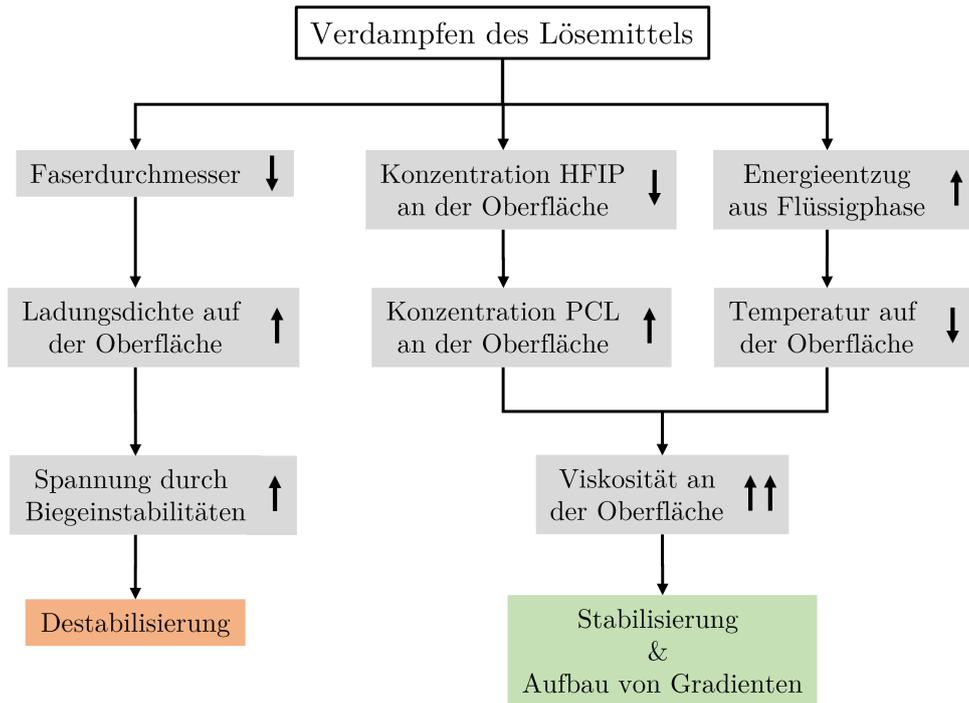
diesem Fall müssten bereits zu Beginn des Prozesses kontinuierlich Fragmente entstehen, die unabhängig voneinander in einem zufälligen Muster auf dem Kollektor auftreffen.

## **Kollektor**

Eine Erklärung für die Gesamtheit der hier vorgestellten Beobachtungen ergibt sich aus den Erkenntnissen der zuvor diskutierten Prozesse. Zum einen muss die Viskosität der Spinnlösung und der Anteil an hochmolekularem PCL hoch genug sein, um die erste Phase, die durch Rayleigh-Instabilitäten induzierte Aufspaltung des Polymerstrahls (Abb. 4.8), zu überstehen. Wie in Abschnitt 3.1.2 dargestellt, ist in Abhängigkeit von der Molekulargewichtsverteilung eine Viskosität der Spinnlösung von mindestens 0,4 Pa·s erforderlich, um Elektrosprühen zu vermeiden. Bei Mischungen aus hoch- und niedermolekularem PCL verschiebt sich diese Grenze mit zunehmendem Anteil langer Ketten auf 1-3 Pa·s. Die hohen Flächenreduktionsraten und die Biegeinstabilitäten aufgrund der elektrischen Abstoßung erzeugen in dieser ersten Phase starke Scherkräfte, die auf den Polymerstrahl wirken (Abb. 4.9-B). Reneker et al. beschreiben wie dadurch hohe Spannungen im Material aufgebaut werden, die sich in einer axialen Ausrichtung der Molekülketten niederschlagen.[113] Die dabei untersuchten polydispersen Systeme aus hoch- und niedermolekularem PCL können potentiell effektiver ausgerichtet werden als die Molekülketten der monodispersen Spinnlösungen.

Zum anderen muss die angelegte elektrische Spannung mit dem Polymerlösungsstrahl einen Taylorkonus erzeugen, darf aber nicht dazu führen, dass die Oberflächenspannung des Strahls im Übergangszustand überschritten wird, was zu einem Jet-Splitting nach Schubert führen würde.[168] Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Fragmente an der unteren Grenze der angelegten elektrischen Spannung entstehen, an der sich gerade noch ein Taylorkonus ausbildet. Bei höheren elektrischen Spannungen werden kontinuierliche Fasern mit kleinerem Durchmesser im Vergleich zu den Fragmenten beobachtet.

Im anschließenden Trocknungsbereich führt die Verdunstung des Lösungsmittels zu drei dominanten Effekten: der einer hohen Flächenreduktionsrate, der Ausbildung eines Konzentrationsgradienten und der Ausbildung eines Temperaturgradienten an der Oberfläche (Abb. 4.11). Die hohe Flächenreduktionsrate wird durch das Verdampfen des Lösungsmittels hervorgerufen und verringert den Durchmesser der Faser weiter. Dies führt zu einer Erhöhung der Ladungsdichte an der Faseroberfläche und damit zu einem kontinuierlichen Anstieg der mechanischen Spannungen im Material, hervorgerufen durch Zugkräfte aufgrund der im elektrischen Feld aufgebauten Biegeinstabilitäten.



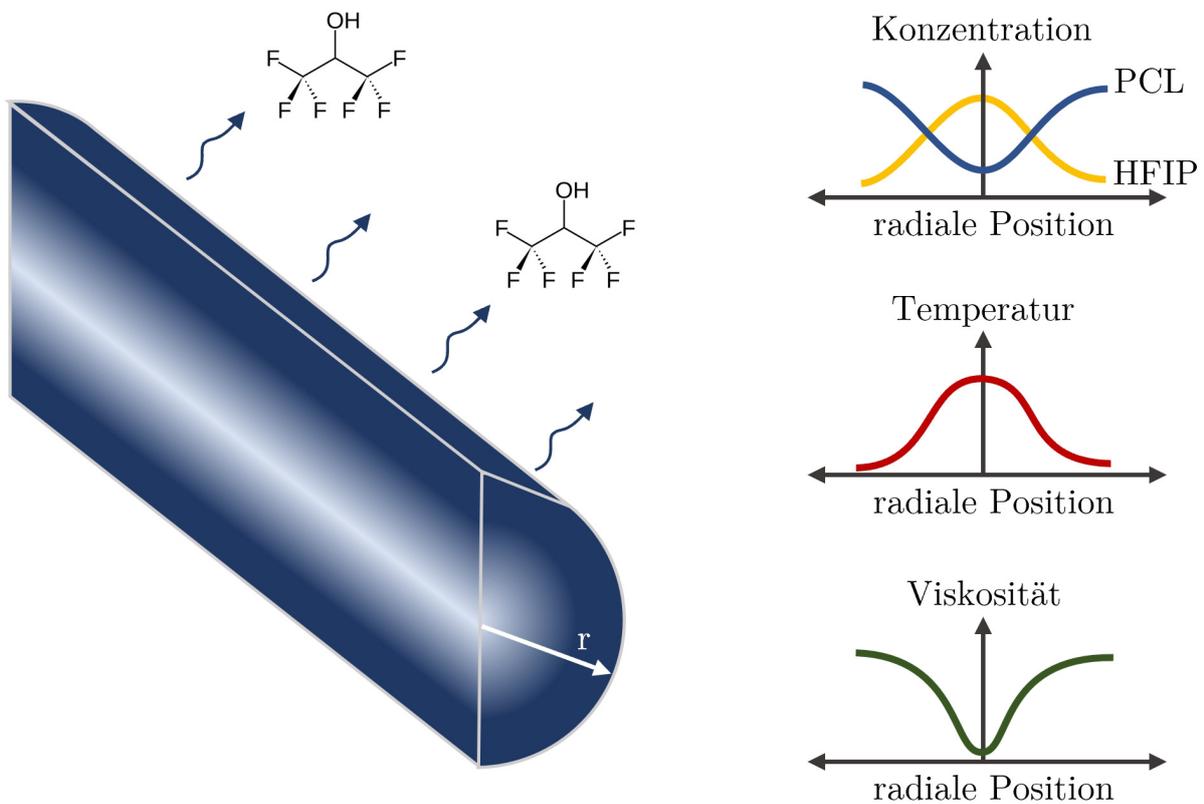
**Abbildung 4.11:** Fließschema der stabilisierenden und destabilisierenden Effekte der Bildung von Faserfragmenten infolge der Verdampfung des Lösungsmittels. Die Pfeile in den Kästchen zeigen jeweils an, ob die entsprechende Größe zunimmt (Pfeil nach oben) oder abnimmt (Pfeil nach unten).

Durch die Verdampfung des Lösungsmittels an der Grenzfläche zwischen Polymer und Umgebungsluft kommt es zusätzlich zu einer Erhöhung der Polymerkonzentration an der Faseroberfläche. Die Ausbildung eines Konzentrationsgradienten führt zur Bildung einer äußeren Hülle (Haut), die von einem flüssigeren Kern getragen wird. Die Ausbildung dieser mechanisch festeren Haut begrenzt die weitere Diffusion des Lösungsmittels und verlangsamt somit die Fasertrocknung. Numerische Simulationen in einem vergleichbaren System aus PAN/DMF von Wu et. al. zeigen deutlich die starke Abhängigkeit der Trocknungszeit vom Ausgangsdurchmesser der Faser.[164] Nach ihren Berechnungen trocknet ein PAN/DMF-Polymerlösungsstrahl mit einem Anfangsradius im Nanometerbereich innerhalb weniger Millisekunden, während die Trocknungszeit einer Faser im Mikrometerbereich in einem Zeitfenster von hunderten Millisekunden bis Sekunden liegt. Dies wird mit der sehr unterschiedlichen Ausbildung der inneren Konzentrationsgradienten (Abb. 4.12) in Abhängigkeit vom Faserdurchmesser erklärt, wobei größere Faserdurchmesser eine sehr viel stärkere Inhomogenität der Lösungsmittelkonzentration über den Querschnitt aufweisen als Fasern mit kleinerem Durchmesser (Nanofasern).[164]

Die in dieser Arbeit hergestellten Fasern weisen einen Enddurchmesser von 3-5  $\mu\text{m}$  bei einem optisch bestimmten Anfangsdurchmesser in der Größenordnung von 40-80  $\mu\text{m}$  auf, sodass eine Trocknungszeit von wenigen Sekunden zu erwarten wäre. Allerdings hat das

hier verwendete Lösungsmittel HFIP einen deutlich höheren Dampfdruck als DMF (205 hPa gegenüber 5 hPa bei 25 °C), was die Trocknungszeit stark verkürzt. Da beide Faktoren linear in das Modell von Wu et al. [164] einfließen, kann davon ausgegangen werden, dass die tatsächliche Trocknungsgeschwindigkeit in dem hier untersuchten System in der Größenordnung von einigen zehn bis wenigen hundert Millisekunden liegt.

Als dritter Punkt ist die Abkühlung der Faseroberfläche infolge der Verdampfungsenthalpie des Lösungsmittels zu nennen. Beim Verdampfen des Lösungsmittels wird der flüssigen Phase latente Wärme entzogen, was zu einer Absenkung der Temperatur an der Faseroberfläche führt. Dieser Effekt führt ebenso wie die Konzentrationsänderung zu einer Erhöhung der Viskosität an der Oberfläche und zur Ausbildung eines Gradienten über den Faserdurchmesser, der die weitere Diffusion des Lösungsmittels hemmt und damit die Trocknungszeit der Faser verlängert.

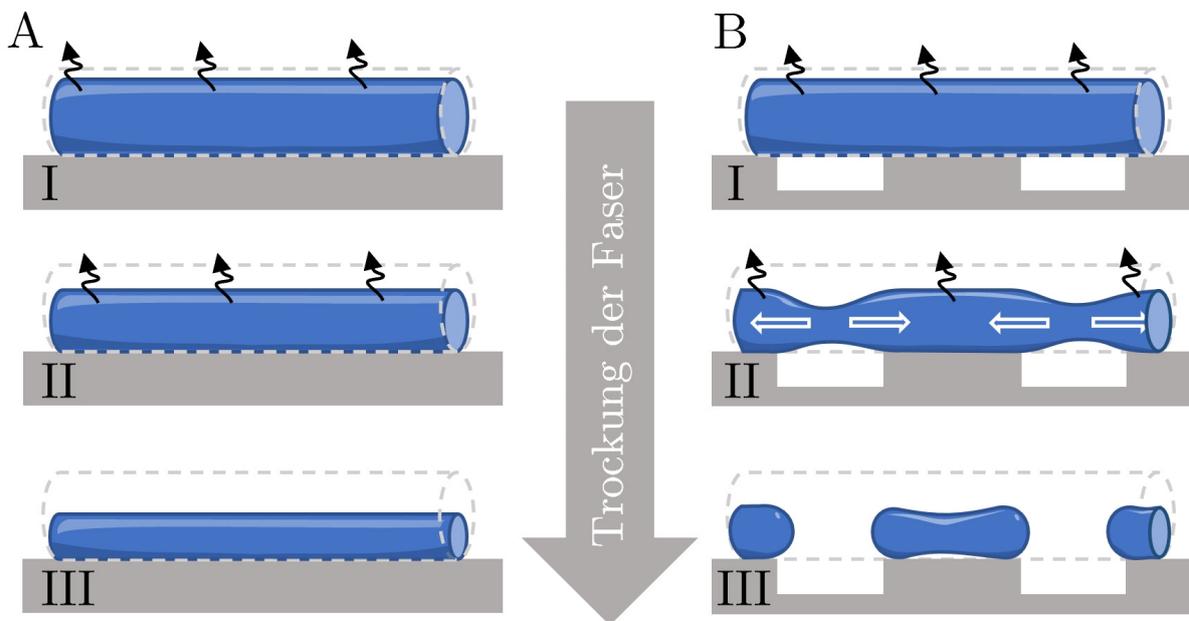


**Abbildung 4.12:** Schematische Darstellung der Gradienten an PCL-Konzentration, Temperatur und daraus folgend Viskosität, die durch Verdampfen des Lösungsmittels HFIP über den Faserquerschnitt (Radius  $r$ ) aufgebaut werden.

Die beiden letztgenannten Effekte tragen somit zur Stabilisierung des Kern-Mantel-Systems bei, einer festen Hülle, die von einem flüssigen Kern getragen wird (Abb. 4.12). Da die Spinnlösung zu Beginn die gleiche Temperatur wie die Umgebung hat, also vor der Verarbeitung weder abgekühlt noch erwärmt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass

der Einfluss des Temperaturgradienten durch Verdampfung in diesem System geringer ist als der des Konzentrationsgradienten.

Beim Auftreffen dieser unvollständig getrockneten Faser auf einen Kollektor kommt es zu einer Entladung der Faseroberfläche und damit zum Wegfall eines Teils der äußeren Kräfte, die für die Dehnung der Faser verantwortlich sind. Die zuvor eingebrachten mechanischen Spannungen, die zu einer Ausrichtung der Molekülketten geführt haben, können nun, je nach Beschaffenheit des Kollektors, durch entropieelastisches Kriechen der PCL-Moleküle teilweise abgebaut werden. Trifft die Faser auf einen ebenen Kollektor (Abb. 4.13-A), so hat sie nach dem Ablegen eine große Anzahl von Kontaktpunkten mit dem Substrat, die zur Stabilisierung beitragen. Dies führt zu einer gleichmäßigen Schrumpfung der Faser über ihre gesamte Länge, bis das restliche Lösungsmittel verdampft und die Faser vollständig ausgehärtet ist (Abb. 4.13-A I-III).



**Abbildung 4.13:** Schematische Darstellung der Faser- und Fragmentbildung in Abhängigkeit von der Strukturierung der Kollektoroberfläche. Bei einem ebenen Kollektor (A) verteilen sich die Spannungen auf eine große Anzahl von Kontaktpunkten, was zu einer gleichmäßigen Schrumpfung der Faser führt (I-III). Bei einer begrenzten Anzahl von Kontaktpunkten (B) bauen sich während des Schrumpfens (I) Spannungen im Faserinneren auf (II), die zum Bruch der äußeren Faserhülle in freihängenden Bereichen führen können (III).

Trifft die Faser jedoch auf einen unebenen Kollektor (Abb. 4.13-B), sei es durch die Bildung eines Vlieses aus bereits abgelegten Fasern oder durch die Verwendung eines oberflächenstrukturierten Kollektors, wird die Anzahl der physischen Kontaktpunkte reduziert. Ohne diese Stabilisierung entstehen Bereiche, in denen die Fasern frei hängend

unter Spannung stehen. Durch die Kombination von entropieelastischem Kriechen zum Abbau der inneren Spannungen und weiterer Kontraktion durch Verdampfen des Lösungsmittels können nun Spannungsspitzen auftreten (Abb. 4.13-B II), die von der äußeren Hülle nicht mehr kompensiert werden können. Diese Hypothese vereint bereits mehrfach beschriebene Effekte, die bei der Trocknung von Polymeren auf ebenen Oberflächen [169, 170] und während des Spinnprozesses [171, 172] auftreten können. In der Folge kann es zum Bruch der Hülle und zum Austritt des flüssigen Restmaterials aus dem Inneren kommen. Nach den Prinzipien der Oberflächenspannung und der Minimierung der Oberflächenenergie zieht sich der austretende Tropfen zu einer Mikrokugel zusammen, was die verdickten und abgerundeten Enden der hier gezeigten Faserfragmente erklärt (Abb. 4.13-B III). Das Aufbrechen der Konzentrations- und Temperaturgradienten in der Faser, die die Verdampfungsgeschwindigkeit des Lösungsmittels begrenzen, führt zusammen mit der vergrößerten Oberfläche dazu, dass das restliche Lösungsmittel verdampfen kann. Die entstandene Morphologie der hantelförmigen Fragmente wird durch diese Effekte stabilisiert, bevor sie mit neu abgelegten Fasern verschmelzen kann.

Zusammenfassend können folgende Randbedingungen für die Herstellung von hantelförmigen Fragmenten durch elektrostatisches Spinnen aus Lösung festgehalten werden:

- Der Grad der internen Verschlaufungen muss groß genug sein, um nach dem Taylorkonus nicht in Elektrospray überzugehen. Gleichzeitig muss die angelegte elektrische Spannung niedrig genug sein, um ein Jet-Splitting zu vermeiden.
- Die sich ausbildende Faserhülle muss elastisch genug sein, damit es im Bereich der Biegeinstabilitäten nicht zum Spröbruch kommt.
- Bei ausreichend großem initialen Faserdurchmesser und entsprechend niedriger Verdampfungsgeschwindigkeit des Lösungsmittels, trifft eine nicht vollständig ausgehärtete Faser auf dem Kollektor auf.
- Wenn genug potenzielle Energie in Form von mechanischen Spannungen durch Kettenausrichtung im Material gespeichert wurde, kann dies bei reduzierten Kontaktpunkten mit dem Kollektor zu ungleichmäßigem entropieelastischem Kriechen führen.
- Wird in diesem Prozess die Stabilität der äußeren Hülle überschritten, führt das zum Aufbrechen der Hülle, und bei ausreichend flüssigem Restmaterial im Inneren, zur Entstehung der hantelförmigen Faserfragmente.

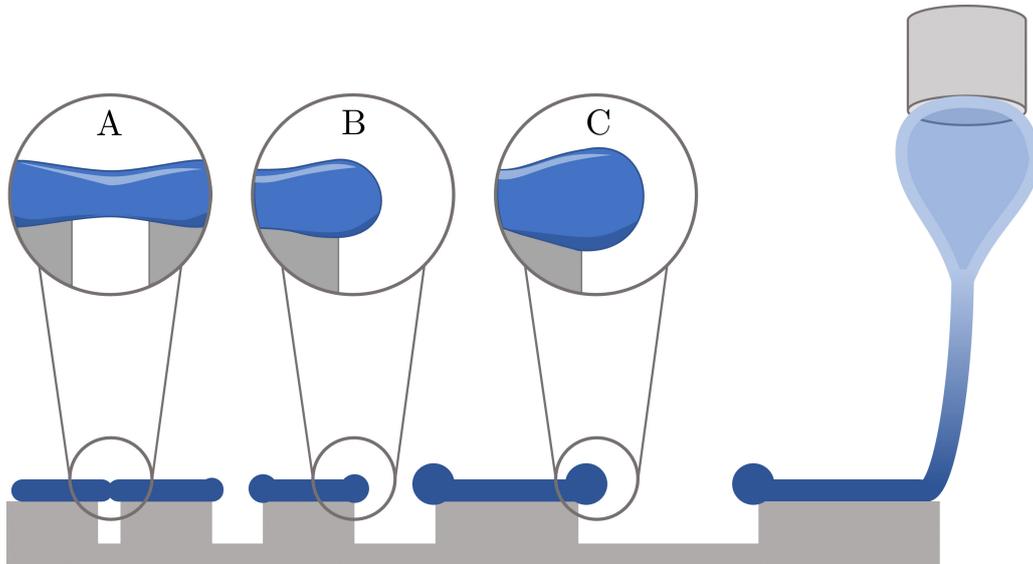
### 4.1.3 Fragmentierung im Schmelz-Elektro-Schreibverfahren

Der Effekt der Faserfragmentbildung kann auch ohne Lösungsmittel aus der Schmelze beobachtet werden. Da Polymerschmelzen unter Scherung ähnliches Verhalten wie unvernetzte Polymerlösungen zeigen, bleiben die Annahmen aus Abschnitt 4.1.1 gültig.[123] Anwendungen der Schmelzextrusion in der Polymerverarbeitung zeigen, dass der benötigte Viskositätsgradient über den Faserdurchmesser allein durch Temperaturänderungen erzeugt werden kann.[147, 152] Ellison et al. demonstrieren die Herstellung von Nanofasern mittels Schmelzblasen, wobei durch Temperaturvariationen der Schmelze ein Übergang von Kugeln zu kontinuierlichen Fasern erreicht wird.[173] In ihrer Studie zeigen Ellison et al., dass für die untersuchten Polymere PS, PP und PBT ein kritischer Punkt erreicht werden kann, bei dem keine intakten Fasern mehr produziert werden können, indem die Schmelzetemperatur um 30 – 60, °C erhöht wird.

Im Schmelz-Elektro-Schreibverfahren wird simultan zum elektrostatischen Spinnen aus Lösung ein elektrisches Hochspannungsfeld appliziert, um die Schmelze zu dehnen und in Richtung des Kollektors zu beschleunigen. Beim MEW-Prozess, mit einem reduzierten Abstand zwischen Kanüle und Kollektor von wenigen Zentimetern, wird der Polymerstrahl präzise auf dem Kollektor abgelegt bevor elektrostatische Instabilitäten auftreten, wie von Brown et al. beschrieben.[115] Die Verwendung einer Klimakammer ermöglicht zusätzlich die Untersuchung von Umgebungsfaktoren wie Lufttemperatur und Luftfeuchtigkeit neben der Schmelzetemperatur.

Die Modifikation der Kollektorgeometrie ermöglicht die Beobachtung vergleichbarer Effekte wie beim elektrostatischen Spinnen aus Lösung. Unabhängig von den untersuchten Parametern Schmelzetemperatur, Umgebungstemperatur und Luftfeuchtigkeit führt die Ablagerung der Polycaprolacton-Schmelze auf einem planaren Kollektor initial zur Bildung kontinuierlicher Fasern. Eine nachträgliche Erhöhung der Umgebungstemperatur auf Werte deutlich oberhalb der Glasübergangstemperatur ( $T_g$ ) und nahe des Schmelzpunktes ( $T_m$ ) kann jedoch zu einem unkontrollierten Aufbrechen dieser kontinuierlichen Fasern führen. Dieser Effekt wird auch beim Tempern von Polymerfasern von Fan et al. beschrieben.[163] In ihrer Studie werden zunächst elektrogesponnene Polystyrol (PS)-Fasern auf einem mit Polymethylmethacrylat (PMMA) beschichteten Glassubstrat abgelegt. Durch anschließendes Erhöhen der Umgebungstemperatur auf 180 – 240 °C ( $T_{g,PS} = 107$  °C;  $T_{m,PS} = 240$  °C) kann ein kontrolliertes Abreißen der Fasern induziert werden. Über einen Beobachtungszeitraum von mehreren Minuten brechen die Fasern auf und bilden zunächst hantelförmige Gebilde bevor sie schließlich in einzelne Kugeln zerfallen. Dieser Prozess des kontrollierten Aufbrechens ermöglicht die gezielte Erzeugung von Polymerstrukturen unterschiedlicher Morphologie ausgehend von Fasern.

Für den MEW-Prozess werden ähnliche hantelförmige Morphologien aus PCL bereits von Brown et al. beschrieben. Die entstandenen Fragmente werden jedoch ausschließlich als Negativbeispiel für nicht angepasste Spinnparameter präsentiert und nicht weiter untersucht.[115] Erst die Verwendung eines Kollektors mit definierter Oberflächenstruktur (Abb. 4.14) ermöglicht die Kontrolle des Fragmentierungsprozesses und die Herstellung von Fragmenten mit präzise eingestellter Länge.[174]



**Abbildung 4.14:** Schematische Darstellung der Morphologie der abgelegten Faser im Schmelz-Elektro-Schreibverfahren in Abhängigkeit vom Stegabstand.

Die zentralen Prozessparameter, mit denen das Fragmentierungsverhalten und die Endgeometrie gezielt beeinflusst werden können, sind die Schmelze- und Umgebungstemperatur, die Druckgeschwindigkeit und die Kollektorgeometrie.

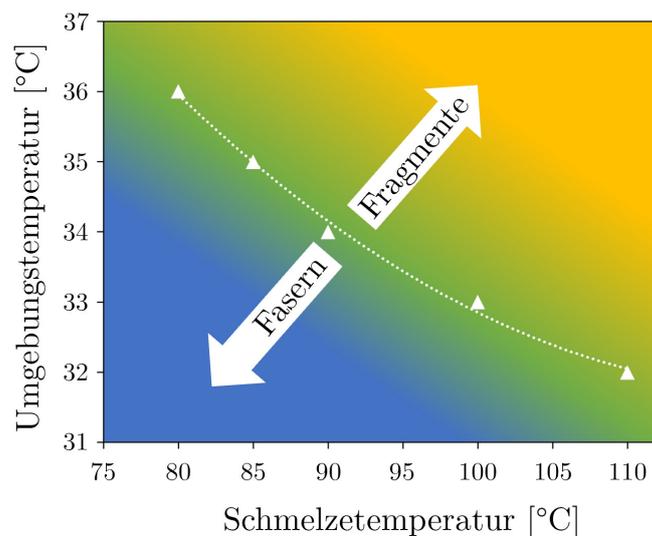
### Druckgeschwindigkeit

Der zweite wichtige Faktor ist die Druckgeschwindigkeit, wobei von der kritischen translatorischen Geschwindigkeit (engl. critical translation speed, kurz CTS) als Referenz ausgegangen wird.[175] Der optimale Bereich des CTS kann visuell als die minimale Bewegungsgeschwindigkeit, bei der eine kontinuierliche und gleichmäßige Faserstruktur erzeugt werden kann, ermittelt werden. Niedrigere Geschwindigkeiten führen zu einer ungleichmäßigen Ablage von Fasern wie in der Literatur beschrieben.[176, 177] Eine Reduzierung der Geschwindigkeit in diesem Fall von 8000 mm/min auf 4000 mm/min und damit von  $2.0 \times \text{CTS}$  auf  $1.2 \times \text{CTS}$ , führt bereits zu einer kontinuierlicheren Fragmentierung. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in der Art wie der Polymerstrahl auf dem Kollektor abgelegt wird. Durch die Bewegung der Kanüle über dem Kollektor und der Massenträgheit des

Polymerstrahls kommt es zu einem Versatz zwischen dessen Ablageort und der Kanülenposition. Dabei gilt, je schneller sich die Kanüle über den Kollektor bewegt, desto größer wird die Distanz zwischen Kanülenspitze und Kontaktpunkt des Polymerstrahls mit dem Kollektor. Dadurch verlängert sich der Weg, den die Faser zum Kollektor zurücklegen muss und gleichzeitig die Zeit, die der Schmelze zur Verfügung steht, um abzukühlen und den Temperaturgradient zwischen Oberfläche und Faserinnerem abzubauen. Damit wird eine stabilere Faser abgelegt, die eine geringere Tendenz zur nachträglichen Fragmentierung aufweist. Andererseits ist es auch möglich eine Fragmentierung von Fasern durch einen zu hohen CTS-Wert zu induzieren. In diesem Fall wird das Material zu schnell auf das Substrat aufgetragen, was zu erhöhten mechanischen Spannungen und damit einer Unterbrechung der Fasern führen kann. Das Verhalten von Fasern oberhalb des CTS wird bereits genutzt, um komplexere Geometrien wie Überhänge, Wandstrukturierungen und Verzweigungen in mehrschichtigen Konstrukten präzise zu erzeugen.[178]

## Temperatur

An erster Stelle ist hier das Zusammenspiel von Schmelze- und Umgebungstemperatur zu nennen. Für die verwendete PCL-Schmelze kann, wie in Abbildung 4.15 dargestellt, ein Bereich bestimmt werden, in dem überwiegend Fragmente entstehen. Dabei bestimmen Schmelze- und Umgebungstemperatur die Ausprägung des Temperaturgradienten an der Faseroberfläche. Als Ausgangspunkt für die Fragmentierung können hier  $90^{\circ}\text{C}$  Schmelztemperatur und  $34^{\circ}\text{C}$  Umgebungstemperatur angenommen werden.



**Abbildung 4.15:** Erzeugte Morphologie in Abhängigkeit von Umgebungs- und Schmelztemperatur. Im Bereich niedriger Umgebungs- und Schmelztemperaturen (blauer Bereich) bilden sich kontinuierliche Fasern. Bei gleichzeitiger Temperaturerhöhung (grüner Bereich) entsteht ein Prozessfenster, das die Bildung von Faserfragmenten begünstigt.

Um kontinuierlich überwiegend Fragmente zu produzieren, zieht eine Absenkung der Schmelztemperatur demnach eine Erhöhung der Umgebungstemperatur nach sich und vice versa. Dieses Verhalten ist im Wesentlichen auf die bereits im vorhergehenden Abschnitt 4.1.2 näher erläuterte Viskositätsänderung bei Temperaturänderung zurückzuführen. Die daraus resultierenden Rayleigh-Instabilitäten führen zum Faserbruch und zur Bildung von Kugeln oder abgerundeten Faserenden. Die charakteristische Zeit  $\tau$  dieses Faserbruchs wird nach Fan et al. [163] von der Viskosität  $\eta$ , dem Anfangsradius  $R_0$  und der Oberflächenspannung  $\sigma$  des Materials beeinflusst:

$$\tau_m = \frac{\eta R_0}{\sigma} \quad (4.1)$$

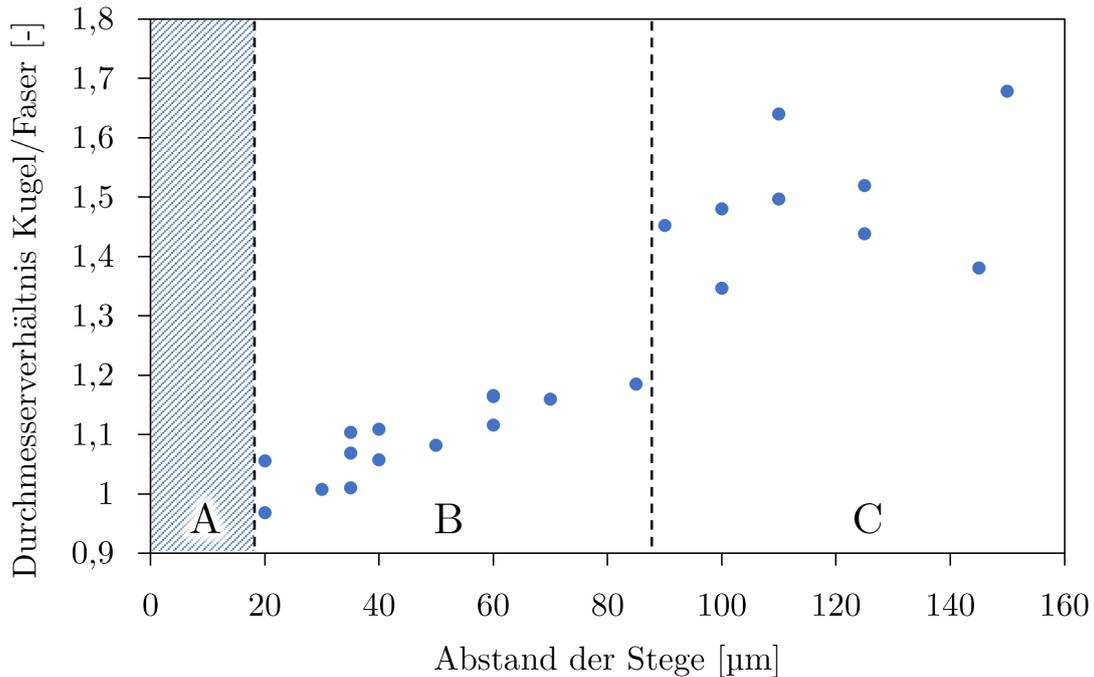
### **Kollektorgeometrie**

Abschließend wird der Einfluss der Strukturierung der Kollektoroberfläche betrachtet. Dazu werden, wie im Abschnitt 2.2.4 beschrieben, Siliziumplättchen mit Stegen variabler Breite und variablem Abstand photolithographisch hergestellt und als Kollektor verwendet. Es kann gezeigt werden, dass die Länge des freitragenden Bereichs der Faser einen Einfluss auf die endgültige Morphologie der Fragmente hat. Je größer der Abstand zwischen den einzelnen Erhebungen des Kollektors ist, desto ausgeprägter ist die Hantelform (Abb. 4.16), die durch die ausgeprägten kugelförmigen Enden definiert wird. Als Hilfsgröße zur Beschreibung der Morphologie wird das Verhältnis von Kugeldurchmesser zu Faserdurchmesser (K/F-Verhältnis) verwendet.

Für das Fragmentierungsverhalten in Abhängigkeit vom Stegabstand lassen sich die drei in Abbildung 4.16 dargestellten Bereiche unterscheiden. Im ersten Bereich mit Abständen unter 20  $\mu\text{m}$  kann keine vollständige Fragmentierung auftreten (Abb. 4.16-A), da die Fragmente noch über die Lücken hinweg verschmolzen sind. Im Bereich von 20  $\mu\text{m}$  bis 85  $\mu\text{m}$  kommt es zu einer reproduzierbaren Fragmentierung der Faser (Abb. 4.16-B), das Verhältnis von Kugel- zu Faserdurchmesser steigt linear von 1 auf 1,2 und erzeugt damit eine kaum erkennbare Hantelform der Fragmente. Ab 85  $\mu\text{m}$  erfolgt ein sprunghafter Anstieg des K/F-Verhältnisses auf 1,7 (Abb. 4.16-C), wobei keine lineare Abhängigkeit nachgewiesen werden kann.

Die Länge der hergestellten Fragmente spielt für die Endform eine untergeordnete Rolle, da kein direkter Zusammenhang zwischen der Stegbreite und der Fragmentgeometrie festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Dieses Verhalten kann durch die unterschiedliche Masse erklärt werden, die in jedem Überhang zur Verfügung steht, um die abgerundeten Enden zu formen. Ein größerer Abstand bedeutet automatisch, dass sich mehr Material im Bereich des Überhangs befindet und beim Bruch der Faser zur

Verschmelzung mit den zylindrischen Abschnitten zur Verfügung steht. Es kann davon ausgegangen werden, dass ab einem maximalen kritischen Wert für den Abstand keine weitere Vergrößerung des Durchmessers der Kugelenden mehr stattfindet, da die große Masse im Überhang eine eigene Kugel bildet und sich nicht mehr mit dem Faserfragment verbindet. Dies wird durch die zunehmende Massenträgheit und Oberflächenspannung des Materials verhindert. Dieser Effekt spiegelt sich in den Daten wider, da ab 85  $\mu\text{m}$  keine deutliche Zunahme des Durchmesserverhältnisses mehr auftritt.



**Abbildung 4.16:** Verhältniss aus Kugel- zu Faserdurchmesser (K/F-Verhältnis) der Fragmente in Abhängigkeit vom Abstand der Stege auf dem Kollektor. Einteilung in die Bereiche (A) unter 20  $\mu\text{m}$ , (B) 20 bis 85  $\mu\text{m}$  und (C) ab 85  $\mu\text{m}$ .

Die Herstellung der Fragmente mittels MEW zeigt Vorteile bei der Kontrolle über die Endmorphologie der Fragmente, da annähernd monomodale Faserverteilungen erzeugt werden können. Die Länge der hergestellten Fragmente hängt direkt von der Stegbreite ab. Zusätzlich kann durch Variation des Stegabstands das K/F-Verhältnis und damit die Form der Fragmente beeinflusst werden. Allerdings ist der nachfolgend betrachtete Durchsatz bei der Produktion mit dem MEW deutlich reduziert und die Möglichkeiten des Scale-up sind bei dieser Verfahrensweise begrenzt.

#### 4.1.4 Faserproduktionsrate im Vergleich

Eine Beispielrechnung für Faserfragmente mit einer Länge von 50  $\mu\text{m}$  zeigt einen großen Unterschied in der Produktionsgeschwindigkeit zwischen MEW und traditionellem Elektrosponnen. Mit einem angenommenen K/F-Verhältnis von 1,4 ergibt sich für das Volumen eines einzelnen Fragments ein Wert von ca. 390  $\mu\text{m}^3$ . Bei einer Dichte von PCL von 1,21  $\text{g}/\text{cm}^3$  sind das 0,472 ng pro Fragment. Für die Herstellung von 1 ml an 1 % w/v faserverstärktem Hydrogel werden 10 mg Fragmente benötigt, folglich rund 21 Mio Stück.

Eine Betrachtung des Durchsatzes beim MEW unter den hier vorgestellten Prozessparametern von 4000 mm/min Druckgeschwindigkeit und einem Abstand von 50  $\mu\text{m}$  zwischen den Fragmenten für ein hohes K/F-Verhältnis, führt zu einer theoretischen Produktionsrate von 40 000 Fragmenten pro Minute, bzw. 2,4 Millionen pro Stunde. Im Vergleich dazu können im Elektrosponnenprozess aus einer 20 % w/v Spinnlösung mit 1 ml/h Volumenstrom, unter Einberechnung von 20 % Verlust der Fragmente, die nicht auf dem Kollektor landen, in einer Stunde über 300 Millionen Fragmente produziert werden.

Für die Materialmenge des angenommenen faserverstärkten Hydrogels müsste ein MEW demnach ca. 9 Stunden ununterbrochen laufen, während der klassische Elektrosponnenprozess die gleiche Menge in weniger als 5 Minuten erzeugt. Da in der Praxis deutlich größere Mengen an faserverstärktem Hydrogel (5-10 ml pro Kartusche) mit höheren Faserkonzentrationen (2-5% für PCL) benötigt werden, ist auf Basis dieser Berechnung das klassische Elektrosponnenverfahren dem MEW vorzuziehen. Dies gilt umso mehr, als weitere Verluste bei der Fragmentierung und während der Beschichtung zu berücksichtigen sind, die die Effizienz beider Verfahren weiter reduzieren. Darüber hinaus kann der Durchsatz beim klassischen Elektrosponnenverfahren mit geringem Aufwand erhöht werden, z.B. durch den Einsatz mehrerer Spritzen (wie im Abschnitt 2.2.2 gezeigt). Diese Form des Scale-up ist beim MEW bisher nicht ohne Weiteres möglich.

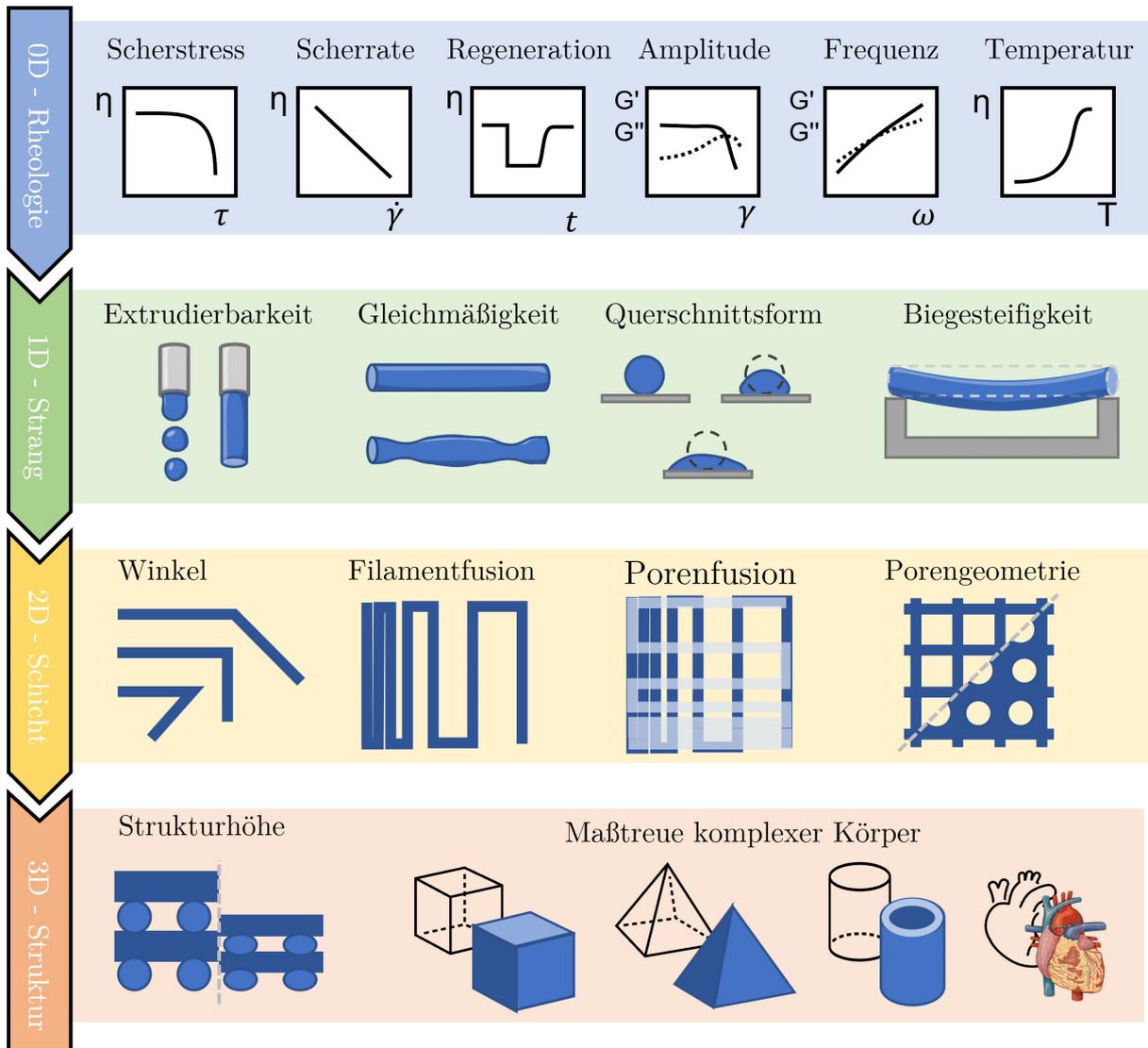
## **4.2 Fließverhalten und Druckbarkeit faserverstärkter Hydrogele**

Im zweiten Teil der Diskussion wird der Einfluss der in dieser Arbeit entwickelten handtelförmigen PCL-Mikrofaserfragmente als Additiv auf die Formstabilität von Hydrogelen für den 3D-Dispensdruck untersucht. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der Entwicklung einer neuen analytischen Methode, um die rheologischen Eigenschaften der untersuchten Hydrogele systematisch mit den Ergebnissen aus praxisnahen Druckversuchen zu korrelieren. Aus diesen Erkenntnissen können Rückschlüsse für das Design neuer Biotinten gezogen werden und dazu beitragen, das Biofabrikationsfenster nach Malda et al. zu erweitern.[127]

### **4.2.1 Vergleich mit Messmethoden aus der Literatur**

Für die Weiterentwicklung des gesamten Feldes der Biofabrikation ist es unabdingbar zukünftig standardisierte Messmethoden anzuwenden, um Forschungsergebnisse vergleichbarer zu machen. So wurden in den letzten Jahren bereits verschiedenste Methoden zur Bewertung der Extrudierbarkeit [179], der Uniformität [180], des Fusionsverhaltens [181–183], der Biegesteifigkeit [184], der Porengeometrie [185, 186] und der allgemeinen Maßhaltigkeit [187, 188] vorgeschlagen und diskutiert, eine Einigung auf standardisierte Verfahren und universell vergleichbare Messparameter kann bisher nicht erzielt werden. Zudem ist der Begriff der Druckbarkeit nicht abschließend definiert und wird in den einzelnen Publikationen unterschiedlich interpretiert. Für eine bessere Vergleichbarkeit und interdisziplinäre Optimierung von Systemen und Materialien sind anwendbare Richtlinien oder Standards jedoch von großer Bedeutung.

Zur besseren Einordnung der in der Literatur beschriebenen Messverfahren werden diese in Abbildung 4.17 nach der Dimension der untersuchten Körper geordnet. Die Rheologie ist dabei als nulldimensional definiert, da hier in der Theorie die Geometrie der zu untersuchenden Probe keinen Einfluss auf die Messergebnisse hat, sondern nur die intrinsischen Materialeigenschaften eine Rolle spielen. Die Extrusion eines einzelnen Stranges und die Methoden zur Untersuchung seines Verhaltens werden als eindimensional klassifiziert. Alle Messverfahren, die das Verhalten mehrerer Stränge in der Fläche untersuchen und dabei insbesondere die Flächenmaße berücksichtigen, werden den zweidimensionalen Messverfahren zugeordnet. Alle darüber hinausgehenden Verfahren zur Untersuchung komplexerer Strukturen im Raum werden schließlich den dreidimensionalen Messverfahren zugeordnet.



**Abbildung 4.17:** Überblick über die in der Literatur beschriebenen Messverfahren zur Bestimmung der Druckbarkeit von Hydrogelen in der Biofabrikation. Teile der Abbildung wurden unter Verwendung von Bildern von Servier Medical Art erstellt. Servier Medical Art von Servier ist lizenziert unter einer Creative Commons Attribution 3.0 Unported Lizenz (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Aufgrund der einfachen Zugänglichkeit, des geringen Materialeinsatzes, der exakten Quantifizierbarkeit und der hohen Informationsdichte werden rheologische Messungen derzeit in den meisten Untersuchungen eingesetzt, um reproduzierbare Aussagen über das Materialverhalten zu erhalten.[179, 185, 189, 190] Die große Bandbreite an unterschiedlichen Messprotokollen und Kennwerten zur Auswertung zeigt jedoch, dass auch in diesem Bereich noch keine verbindlichen Standards etabliert sind.

## 4.2.2 Scherrheologische Evaluation

Aus diesem Grund wird ein neues scherrheologisches Messprotokoll entwickelt. Ziel dabei ist die wichtigsten bekannten Einflussgrößen in einem einzigen Protokoll mit möglichst geringem Material- und Zeitaufwand zu bestimmen. Mit dem in Abschnitt 2.2.6 vorgestellten Protokoll können, nach einem vorgeschalteten Amplitudenversuch zur Bestimmung des LVE, in ca. 40 min und mit 200  $\mu\text{l}$  Materialeinsatz pro Messvorgang Informationen über das Verhalten des Speicher- und Schermoduls im Amplituden- und Frequenzversuch, der komplexen Viskosität im Frequenzversuch, des Regenerationsverhaltens nach Entlastung und des Fließverhaltens im Rotationsversuch gewonnen werden. Dies ermöglicht eine umfassende Betrachtung der rheologischen Eigenschaften und bildet den Ausgangspunkt für die nachfolgenden Auswertungen. Erste Ansätze zur Bestimmung von Kenngrößen für die Druckbarkeit, wie die alleinige Verwendung der Viskosität [191–194] oder des Fließpunktes [195], haben sich als extrem material- und prozessabhängig erwiesen. Sie sind daher als systematische Größen ungeeignet und sollten durch robustere Kennwerte ersetzt werden.

Der Verlustfaktor  $\tan \delta$ , gebildet aus dem Verhältnis von Speichermodul ( $G'$ ) zu Verlustmodul ( $G''$ ), wird in diesem Zusammenhang von verschiedenen Autoren als unabhängige und leicht übertragbare Größe ins Spiel gebracht.[180, 195, 196] Diese dimensionslose Kennzahl wird von Markstedt et al. verwendet, um die Druckbarkeit von Alginathydrogelen mit Nanocellulose als Additiv zu bestimmen.[195] Sie halten dabei fest, dass druckbare Tinten einen Wert von  $\tan \delta$  kleiner als 1 haben müssen. Dies ist nicht überraschend, da bei Werten über 1 der Verlustmodul größer als der Speichermodul ist und somit ein viskoses Verhalten zu erwarten ist. In diesem Bereich kann keine ausreichende Formstabilität für den 3D-Druck erreicht werden. Konkretere Aussagen zu optimalen Werten für  $\tan \delta$  werden von Petta et al. [196] und Gao et al. [180] getroffen. Erstere können ein Hydrogel aus modifizierter Hyaluronsäure bei  $\tan \delta$  von 0,5 bis 0,6 optimal verdrucken, während Gao et al. den Bereich von 0,25 bis 0,45 für ein Kompositgel aus Gelatine und Alginat als optimal definieren.[180, 196]

Diese Diskrepanz zeigt bereits, dass auch der Verlustfaktor  $\tan \delta$  nicht als alleiniger Kennwert für die Druckbarkeit herangezogen werden sollte. Gao et al. weisen in ihrer Diskussion selbst darauf hin, dass sie mit anderen Hydrogelen aus Pluronic auch im Bereich deutlich unter 0,25 sehr gute Druckergebnisse erzielen.[180] Der Verlustfaktor ist also ebenfalls stark materialabhängig, zudem wird bei seiner Bewertung meist der Absolutwert von Speichermodul und Verlustmodul vernachlässigt, da hier nur das Verhältnis bei einer bestimmten Amplitude oder Frequenz betrachtet wird. Die Absolutwerte geben jedoch ebenfalls wichtige Informationen über die Stärke der internen Vernetzungen im untersuchten Hydrogel. Die Betrachtung nur dieses einen Parameters ist zu eindimensional, um die

komplexen Zusammenhänge im Fließverhalten von Hydrogelen zu beschreiben. Aufgrund der eingeschränkten Aussagekraft wird daher  $\tan \delta$  nicht als zentraler Parameter zur Bewertung herangezogen, sondern ein komplexeres rheologisches Modell entwickelt, um die maßgeblichen Einflussgrößen besser abbilden zu können.

Den gleichen Grundgedanken beschreibt auch der Ansatz von Göhl et al.[197]. Diese Autoren haben ein Alginathydrogel mit Nanocellulose mit Hilfe von Frequenz- und Amplitudentests rheologisch charakterisiert und aus den Speicher- und Verlustmodulen Werte für die Relaxationszeit  $\lambda$  und die Viskosität  $\eta$  ermittelt. Diese Werte werden in ein lineares rheologisches PTT-Modell integriert, um das Fließverhalten in einem Druckversuch *in silico* zu simulieren und anschließend mit praktischen Druckversuchen zu vergleichen.[197] Dabei erreichen sie eine gute Übereinstimmung zwischen simulierten und praktischen Druckversuchen. Allerdings zeigt das verwendete rheologische Modell eine deutliche Abweichung von den Messdaten und wird ohne Angabe des Bestimmtheitsmaßes  $R^2$  dargestellt. Außerdem ist die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse kritisch zu betrachten, da nur zwei Hydrogele auf Alginatbasis miteinander verglichen werden und jeweils nur ein Druckversuch zur Validierung durchgeführt wird. Zur Erzielung einer besseren Übereinstimmung des Modells mit den rheologischen Messwerten wird in dieser Arbeit im ersten Schritt eine Abbildung der Messwerte mit Hilfe der Modelle nach Power-Law und Carreau-Yasuda durchgeführt. Für alle untersuchten Proben liegt das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  über 0,97 und zeigt damit eine gute Übereinstimmung zwischen dem Modell und den Messwerten.

Unvernetztes Alginat ohne Fasern zeigt hier einen deutlichen Fließpunkt bei niedrigen Frequenzen und wird daher gut durch das Modell nach Carreau-Yasuda beschrieben. Ab einer kritischen Faserkonzentration von 1 % CeNF bzw. 10 % PCL wird das Verhalten jedoch besser durch das Power-Law-Modell beschrieben. Für die Hydrogele aus Pluronic und eADF4(C16), die über den gesamten untersuchten Frequenzbereich ein schererdünnendes Verhalten zeigen, ist eine Beschreibung durch Power-Law-Parameter für alle Materialkombinationen gut geeignet. Die Fließkoeffizienten steigen in allen untersuchten Systemen durch die Zugabe von Fasern an, was ein Indiz für eine höhere Formstabilität im Ruhezustand ist, während die Power-Law-Indizes im Bereich von 0,9 bis 0,94 konstant bleiben. Auf das grundsätzliche Verhalten der Hydrogele unter Scherbeanspruchung hat der Faserzusatz somit keinen maßgeblichen Einfluss.

### 4.2.3 Rheologische Modellierung

Die gewonnenen rheologischen Erkenntnisse können zur Erstellung komplexerer Modelle und zur Beschreibung des Fließverhaltens von Verbundwerkstoffen verwendet werden. Die beste Übereinstimmung für diese Anwendung wurde in dieser Arbeit in Abschnitt

3.2.3 mit dem integrierten Burgers-Modell erzielt. Mit diesem Modell ist es möglich, den Einfluss der einzelnen Modellparameter in Abhängigkeit vom Anteil der Faserfraktion zu bestimmen und Vorhersagen darüber zu treffen, wie sich die Zugabe von Fasern in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Rheologie der Hydrogele auswirkt. Dabei wurde deutlich, dass CeNF bereits bei geringen Konzentrationen einen deutlich effektiveren Einfluss auf das Verhalten des Komposits haben. Sowohl für die Elastizitätsmodule  $E_1/E_2$  als auch für die Dämpferviskositäten  $\eta_1/\eta_2$  werden deutlich höhere Werte erreicht als für PCL bei gleicher Konzentration. Diese Beobachtung kann hauptsächlich auf die um mehrere Größenordnungen größere aktive Oberfläche der Nanofasern im Vergleich zu den Mikrofasern zurückgeführt werden.

Eine Betrachtung der rheologischen Modellparameter zeigt für Pluronic, dass die Formstabilität des Kompositgels von den Eigenschaften der Matrix dominiert wird. Weder für die Dämpferviskositäten noch für die charakteristische Zeit kann unabhängig von Fasertyp und Füllgrad ein klarer Trend festgestellt werden. Eine Betrachtung der charakteristischen Zeiten zeigt einen sehr geringen Effekt der beiden Fasersysteme in Pluronic, während CeNF in Alginat zu einer starken Erhöhung der charakteristischen Zeit des Maxwell-Elements führt. Ein ähnlicher Effekt wird mit PCL erst bei maximaler Faserkonzentration erreicht, die charakteristische Zeit des Kelvin-Voigt-Elements bleibt jedoch in beiden Fällen nahezu unverändert.

Diese Ergebnisse spiegeln sich jedoch nicht in den praxisnahen Druckversuchen wider. Im Gegensatz zu CeNF, bei dem die Formstabilität von Pluronic mit steigendem Füllgrad kontinuierlich zunimmt, kommt es beim Überschreiten der kritischen PCL-Fragmentkonzentration (5 %) zu einem gegenteiligen Effekt. Während Pluronic als Einzelkomponente nach der Verarbeitung mittels Dispensdruck sehr formstabil ist, führt die Zugabe von mehr als 5 % w/v PCL-Fasern zum Hydrogel zu einem raschen Kollaps der gedruckten Struktur innerhalb von nur 30 Sekunden, wodurch sich unförmige Tropfen bilden. Die in Abschnitt 3.2.2 dargestellten rheologischen Kennwerte deuten jedoch darauf hin, dass die Zugabe von PCL das Material verstärkt, da unter anderem die Kennwerte Speichermodul und komplexe Viskosität mit zunehmender Faserkonzentration ansteigen. Die durchgeführten Messungen sind jedoch nicht in der Lage, das beobachtete Verhalten in der Rheologie zu reproduzieren. Die Grenzen der Rheologie bei der Vorhersage des Materialverhaltens werden in der Literatur unter anderem von Paxton et al. [179], Hu et al. [183] und Gillispie et al. [198] beschrieben und werden auch in den Ergebnissen dieser Arbeit in Abschnitt 3.2 deutlich.

Eine Korrelation dieses Effektes mit den REM-Analysen aus Abschnitt 3.2.1 deutet darauf hin, dass durch die Anwesenheit der hydrophoben PCL-Fragmente eine strukturelle Veränderung in der Hydrogelmatrix stattfindet. So weisen die Proben aus 20 % w/v Plu-

ronic bereits unverstärkt einen höheren Feststoffanteil auf als andere Hydrogele (in der Regel kleiner 10%), durch die Zugabe der PCL-Faserfragmente wird dieser jedoch weiter erhöht. Einerseits kann dadurch im REM eine Verringerung der Porengröße beobachtet werden, andererseits führt die Einbettung der Fasern in die Polymermatrix auch zu einer Verringerung der Wandstärke der getrockneten Probe (Abb. 3.12). Ähnliche Effekte in Pluronic werden bereits von Pandit et al.[199], Gilbert et al.[200] und zuletzt von Gjerde et al.[201] beschrieben. Während bei Pandit et al. und Gilbert et al. die Zugabe von Salzen bzw. medizinischen Wirkstoffen zu einem Stabilitätsverlust des Pluronic Hydrogels führt, untersuchen Gjerde et al. den spezifischen Einfluss von PCL-Endgruppen auf das Hydrogel. Durch Modifizierung des Blockcopolymers mit PCL-Endgruppen zeigen sie, dass eine Erhöhung der hydrophoben Anteile die Wasserlöslichkeit reduziert, Anomalien in der komplexen Viskosität hervorruft und die mizellare Netzwerkstruktur stört, was sich negativ auf die Formstabilität des Gels auswirkt.[201] Es ist davon auszugehen, dass ähnliche Effekte auch bei der Zugabe einer hohen Konzentration von PCL-Fasern auftreten und zu einer Störung der weitreichenden intramolekularen Wechselwirkungen innerhalb der Wasserstoffbrückenbindungen des Blockcopolymernetzwerks führen.

#### **4.2.4 Praxisnahe Druckversuche**

Diese Abweichung vom erwarteten rheologischen Verhalten unterstreicht die Bedeutung verfahrensspezifischer Messverfahren. Obwohl die Rheologie eine wichtige Methode zur Bestimmung der Materialviskosität und -elastizität darstellt, ist sie nicht immer in der Lage, das Materialverhalten unter realen Bedingungen zu erfassen. Daher ist es für ein umfassendes Bild unerlässlich, Materialprüfungen unter realen Verarbeitungsbedingungen durchzuführen. In der wissenschaftlichen Literatur werden diese praxisnahen Messmethoden zur Bestimmung der Druckbarkeit von Biotinten häufig unterschiedlich eingesetzt und kombiniert, um Aussagen über die jeweilige Definition der Druckbarkeit zu treffen. Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die Verwendung verschiedener Tests und Messmethoden in Publikationen zur Druckbarkeit von Biotinten in der Biofabrikation.

Ein bereits 2007 von Therriault et al. vorgeschlagener quantifizierbarer Test ist der sogenannte Filament-Collapse-Test, bei dem ein oder mehrere Stränge über unterschiedlich weit entfernte Stege gedruckt werden.[184] Eine Analyse der freien Fläche unter dem frei hängenden Strang erlaubt Rückschlüsse auf dessen Formstabilität, insbesondere die Biegesteifigkeit. Dieser Test hat den Vorteil, dass er eine Quantifizierbarkeit ermöglicht, die bisher meist nicht gegeben war.

Methode Publikation	0D Rheologie						1D Strang			2D Schicht		3D Struktur		ergänzende Tests							Quelle						
	Scherrate	Erholung	Aplritude	Frequenz	Temperatur	Viskosimeter	rheologische Parameter	Extrusion	Gleichmäßigkeit	Querschnittsform	Biegesteifigkeit	Winkel	Strangfusion	Porengeometrie	kritische Höhe	Maßbreite	µCT	SEM	Indentation	Kompression		Zugversuch	Schwellung	Degradation	numerische Simulation	Zellkultur	Jahr
Therriault et al.			•	•	•	•				•															2007	[184]	
Murphy et al.															•						•	•			•	2012	[191]
Hockaday et al.															•	•	•			•	•				•	2012	[187]
Chung et al.				•	•			•				•							•	•			•			2013	[189]
Wüst et al.	•				•							•					•	•		•	•				•	2014	[181]
Duan et al.	•											•			•					•					•	2014	[193]
Markstedt et al.	•		•	•					•	•				•	•				•	•					•	2015	[195]
Zhao et al.					•			•					•												•	2015	[202]
Blaeser et al.	•				•										•									•	•	2015	[203]
Tabriz et al.					•														•	•			•		•	2015	[204]
He et al.						•		•	•	•	•										•				•	2016	[194]
Ouyang et al.					•			•	•	•			•							•					•	2016	[185]
Li et al.	•	•	•	•		•		•	•				•	•												2016	[205]
Ouyang et al.	•	•		•				•	•				•							•			•		•	2016	[206]
Paxton et al.	•	•			•			•	•					•											•	2017	[179]
Ribeiro et al.	•		•			•				•		•	•	•												2017	[182]
Göhl et al.			•	•		•			•															•		2018	[197]
Habib et al.	•							•	•	•		•	•		•			•	•						•	2018	[186]
Gao et al.			•			•		•						•												2018	[180]
Hazur et al.	•		•	•		•									•					•					•	2020	[190]
Hu et al.	•	•	•	•	•			•			•	•							•							2020	[183]
Haider et al.	•	•	•	•	•					•	•								•						•	2021	[207]
Lechner et al.	•	•	•	•	•			•		•					•										•	2021	[208]
Nelson et al.	•	•	•			•		•	•	•			•	•	•			•	•			•		•	•	2021	[209]
Fu et al.	•	•			•	•		•	•					•										•		2021	[210]

**Tabelle 4.1:** Übersichtstabelle über die in der Literatur verwendeten Kombinationen von Methoden zur Bestimmung der Druckbarkeit von Hydrogelen.

Spätere Arbeiten wie Chung et al. [189], Zhao et al. [202] und Ouyang et al. [185] etablieren die Verwendung einfacher zweidimensionaler Gitterstrukturen, bei denen die Porenform und -größe nach dem Druck bestimmt wird. Als ideal werden quadratische Poren mit den exakten Abmessungen des CAD-Modells angesehen. Eine Erweiterung dieser Methode ist der sogenannte Filament-Fusion-Test, bei dem ein einzelner mäandernder Strang mit schrittweise zunehmenden Abständen gedruckt wird, um zu untersuchen, ab welchem Abstand die benachbarten Stränge nicht mehr miteinander verschmelzen.[182, 183, 207] Habib et al. kombinieren diese beiden Methoden, indem sie zwei mäandernde Stränge im rechten Winkel versetzt übereinander drucken und so eine Gitterstruktur mit variabler Porengröße erzeugen.[186]

In neueren Studien wird jedoch wieder vermehrt der Ansatz von Therriault et al. verwendet [184], wobei nun meist nur noch der Auslenkwinkel im Fokus steht.[182, 186, 207, 208] Das bedeutet, dass der Winkel zwischen dem Strang und der horizontalen Ebene gemessen wird, um Rückschlüsse auf die Formstabilität des Materials zu ziehen, wodurch die Flächenbestimmung überflüssig wird.

Ein Nachteil bei der Verwendung von häufig verwendeten Gittern als Testmuster ist, dass im Gegensatz zu Einzelsträngen deutlich mehr Material benötigt wird, um eine aussagekräftige Bewertung des Druckverhaltens zu ermöglichen. Ein hoher Materialverbrauch bei 2D- und 3D-Versuchen ist insbesondere dann problematisch, wenn aufwendig hergestellte Additive oder lebende Zellen in das Material eingebracht werden sollen. Der Materialverbrauch spielt hier eine kritische Rolle für die breite Anwendbarkeit der Methode. Um den Materialverbrauch bei 2D- und 3D-Tests zu reduzieren, können alternative Testmethoden wie computergestützte Simulationen eingesetzt werden.[197, 203, 210] Darüber hinaus können mit Hilfe von Simulationen verschiedene Parameter wie Druckgeschwindigkeit, Materialzusammensetzung und Formparameter in größerem Umfang untersucht werden.

Dies wird jedoch erst durch den Einsatz reproduzierbarer und quantitativ auswertbarer Messverfahren zur Definition der Materialparameter für die Simulation möglich. In naher Zukunft wird die Optimierung von Biotinten für die Biofabrikation durch maschinelles Lernen eine immer wichtigere Rolle spielen. Dabei können umfangreiche Datensätze aus verschiedenen Tests verwendet werden, um das Verhalten von Materialien vorherzusagen und zu optimieren. Es ist jedoch von entscheidender Bedeutung, dass die Tests selbst standardisiert und quantifizierbar sind, um aussagekräftige und zuverlässige Daten zu liefern.

### 4.2.5 Einfluss der Zeitabhängigkeit

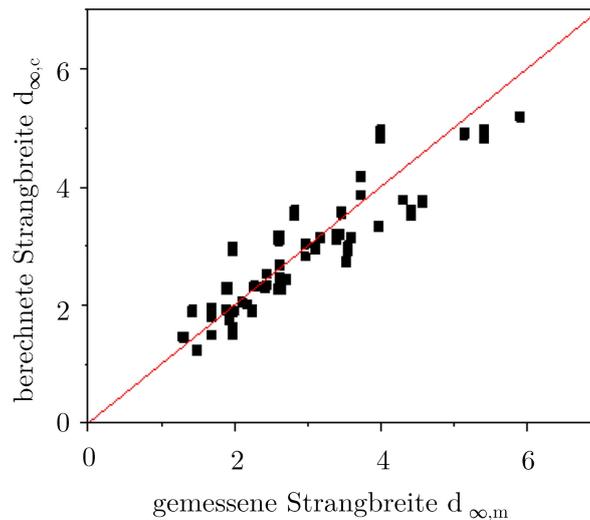
Ein weiterer wichtiger Punkt, der oft vernachlässigt wird, ist die Zeitabhängigkeit des Materialverhaltens. In der Rheologie kann dies teilweise durch Regenerationsverhalten und Frequenztests abgebildet werden. Bei Druckbarkeitstests werden jedoch meist nur einzelne Bilder zu einem definierten Zeitpunkt (in der Regel direkt nach dem Druck) aufgenommen und zur Auswertung herangezogen. Dies führt dazu, dass nur ein statischer Endzustand betrachtet wird und alle Informationen über das dynamische Verhalten des Materials verloren gehen. Für die Anwendung als Biotinte ist es jedoch wichtig zu verstehen, wann das Material fließt, wie schnell es fließt und wann es einen Gleichgewichtszustand erreicht. Bisher haben sich nur einzelne Studien mit dem zeitabhängigen Verhalten beschäftigt. So untersuchten Li et al. das zeitabhängige Verhalten von Alginate-Hydrogelen mit Graphenoxidanteilen.[205] Sie beobachten die Breite von gedruckten Einzelsträngen über einen Zeitraum von 20 Minuten und drucken zusätzlich Gitterstrukturen mit 9 Schichten. Dabei stellen sie fest, dass eine Ruhezeit von 30 Sekunden zwischen den Schichten zu einem besseren Druckergebnis führt. Ouyang et al. führen eine Untersuchung an Hydrogelen aus modifizierter Hyaluronsäure durch.[185] Dabei wird der Querschnitt der gedruckten Einzelstränge sowie das Fließverhalten der Gele über die Zeit unter dem Einfluss eines Photovernetzers und der Belichtungszeit untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass eine höhere Belichtungszeit zu einer höheren Vernetzungsdichte und einer besseren Dimensionsstabilität der gedruckten Stränge führt. Weiterhin wird festgestellt, dass die Modifizierung der Hyaluronsäure zu einer höheren Viskosität und besseren Druckbarkeit der Gele führt, der zeitabhängige Einfluss wird hier jedoch vernachlässigt.

### 4.2.6 Systematischer Ansatz zur Korrelation von praxisnahen Druckversuchen mit rheologischen Kennwerten

Darauf aufbauend können mit dem in Abschnitt 3.2.4 vorgestellten Versuchsaufbau Fließverhalten und Formstabilität von Einzelsträngen nach dem Druck gemessen werden. Dabei wird insbesondere die Fließeigenschaft des Werkstoffes nach dem Druck unter Vergrößerung der Strangbreite untersucht. Diese Messmethode erlaubt die zeitabhängige Strangverbreiterung als Indikator für die Beurteilung der Formstabilität und Druckauflösung zu identifizieren.[211] Dazu werden die beiden Parameter  $\kappa$  (theoretischer Strangquerschnitt) und  $\eta_1$  (Dämpfungviskosität des Maxwell-Elements) als maßgeblich für den Wert der Strangbreite im Gleichgewichtszustand  $d_\infty$  identifiziert. Auf dieser Basis wird Gleichung 4.2 entwickelt, die eine gute Näherung für das beobachtbare Verhalten darstellt und als Extrapolationstool für weitere Experimente verwendet werden kann.

$$d_{\infty,c} = 3,39\text{mm} \cdot \left(\frac{\kappa}{\text{mm}^2}\right)^{0,46} \cdot \left(\frac{\eta_1}{\text{Pa s}}\right)^{-0,7} \quad (4.2)$$

Der Zusammenhang zwischen gemessener (Abschnitt 3.2.4) und berechneter Strangbreite im Gleichgewichtszustand für alle Kombinationen von Füllgraden in Alginat ist in Abbildung 4.18 dargestellt. Die eingezeichnete Regressionsgerade (rote Linie) stellt ein ideales Modell der gemessenen Werte dar und erlaubt eine Beurteilung der Anwendbarkeit des hier beschriebenen Ansatzes.



**Abbildung 4.18:** Vergleichende Darstellung numerisch und experimentell ermittelter Werte der Strangbreite für unverstärktes und faserverstärktes Alginat 3% Hydrogel. Regressionsgerade (rote Linie) zur Beurteilung des linearen Zusammenhangs der numerischen ( $d_c$ ) und experimentell ( $d_m$ ) ermittelten Strangbreite im Equilibrium.

Die Korrelation zwischen der Strangbreite im Gleichgewicht und dem Strangquerschnitt  $\kappa$  mit den viskoelastischen Modellparametern (Abb. 4.18) zeigt eine gute Anwendbarkeit des hier vorgestellten Ansatzes zur Vorhersage der Druckbarkeit von faserverstärktem Alginat. Damit können diese Erkenntnisse als Erweiterung bisheriger Annahmen dienen, wonach der Maxwelldämpfer  $\eta_1$  hauptsächlich für das Fließverhalten eines gedruckten Hydrogelstranges im 3D-Biodruck verantwortlich ist.[211]

Der theoretische Exponent für die Korrelation von  $d_\infty$  und  $\kappa$  kann in diesem Fall nach Schubert [212] mit 0,5 bestimmt werden. Nach der Theorie von Schubert haben jedoch die intrinsischen Viskositäten der Materialien und damit die Dämpferviskositäten des rheologischen Modellsystems keinen Einfluss auf die Strangbreite im Gleichgewicht. Dieser Unterschied ist vermutlich auf den Einfluss der Trocknung der Oberfläche des gedruckten Stranges zurückzuführen, die ab einer kritischen Zeit das Fließen weiter ein-

schränkt. Folglich führen hohe Dämpfungviskositäten zu einem geringeren Strangfluss und einer geringeren Strangbreite bei Erreichen der kritischen Trocknungszeit. Daraus ergibt sich auch eine Reduktion der experimentell ermittelbaren Strangbreite im Vergleich zur Modellierung.[211, 212] Da das Störverhalten der PCL-Fragmente in Pluronic nur bei hohen Werten von  $\kappa$  beobachtet werden kann, ist es wichtig, die Druckparameter genau festzulegen und zu dokumentieren. Nur dann können belastbare systematische Aussagen über das Druckverhalten gemacht werden.

Vergleiche der hier ermittelten Daten mit in der Literatur dargestellten Druckversuchen sind daher nur bedingt aussagekräftig. In den meisten Fällen wurden die Druckgeschwindigkeiten konstant gehalten und mit variablen Prozessdrücken der Durchsatz variiert, um das gewünschte Druckergebnis zu erzielen.[180, 194, 202, 203] Hier fehlt jedoch häufig eine vorherige Analyse der verwendeten Extrusionsdrücke mit dem Materialdurchsatz, um eine Korrelation und systematische Übertragung dieser Größen zu ermöglichen. Sowohl der Materialdurchsatz als auch die Druckgeschwindigkeit müssen dokumentiert und veröffentlicht werden, um eine Interpretation der realen Materialeigenschaften und deren Einfluss auf die Druckergebnisse zu ermöglichen. Die hier vorgestellten Ergebnisse und Methoden leisten somit einen neuen Beitrag zur systematischen Messung, Modellierung und Dokumentation der Rheologie komplexer Kompositsysteme aus faserverstärkten Hydrogelen. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der gewonnenen Daten und Modellparameter bezieht sich auf die Dynamik der Vernetzung. Mit Hilfe der vorgestellten Methoden kann der Zeitrahmen eingegrenzt werden, in dem die Vernetzung einer Biotinte abgeschlossen sein muss, um ihre strukturelle Integrität zu erhalten. Darüber hinaus muss es das Ziel sein, ein umfassendes Verständnis des Verhaltens von Biotinten während des gesamten Druckprozesses zu erlangen.

#### **4.2.7 Limitierungen dieses Ansatzes**

Eine Limitierung des hier vorgestellten Ansatzes besteht darin, dass aufgrund des Versuchsaufbaus nur das Verhalten einer einzelnen Schicht auf Glas beobachtet werden kann. In der Literatur wird beispielsweise von Ribeiro et al. darauf hingewiesen, dass die Effekte der ersten Schicht überschätzt werden, da bei höheren Strukturen mehr als 90% der Wechselwirkung zwischen den Hydrogelen stattfindet und die Wechselwirkung mit der Glasoberfläche nur einen sehr geringen Einfluss auf die finale Struktur hat.[182] Es ist daher notwendig, dies beim Design zukünftiger Versuchsaufbauten zu berücksichtigen, um robustere Ergebnisse zu erhalten. Allerdings wird es schwieriger, die exakte Ausdehnung des gedruckten Strangs auf einem Hydrogelträger zu bestimmen, da optische Auflösungsgrenzen ein Problem darstellen. Möglicherweise können Farbstoffe verwendet werden, um

die zu untersuchende Schicht von der darunter liegenden Schicht abzugrenzen. Es muss jedoch sichergestellt werden, dass das Fließverhalten des Hydrogels davon nicht beeinflusst wird. Bei unserem Verfahren wurde die Grenzflächenwechselwirkung zwischen den Hydrogelen mit hohem Wassergehalt und der hydrophoben Glasoberfläche ausgenutzt, um mit der verwendeten Beleuchtung eine präzise optische Erkennung der Außenkanten des gedruckten Hydrogelstrangs zu ermöglichen. Ohne diesen Kontrasteffekt ist eine automatisierte und präzise zeitaufgelöste Beobachtung des Fließverhaltens im vorgestellten Versuchsaufbau derzeit nicht realisierbar.

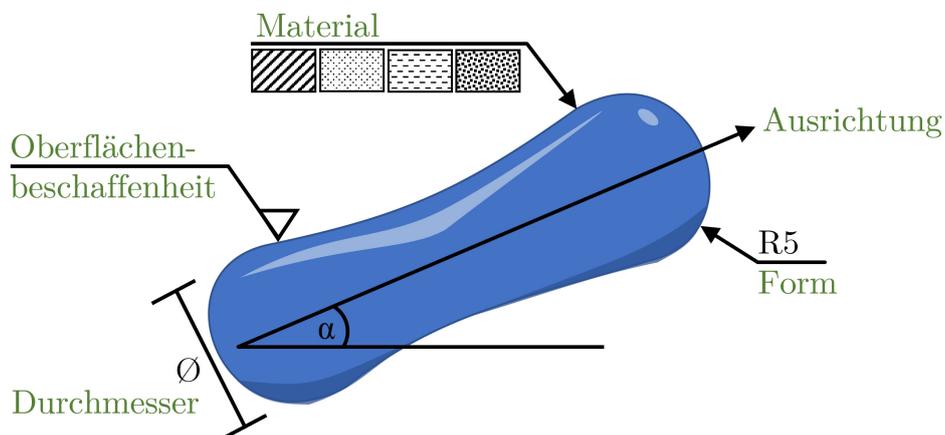
Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die Fließeffekte im aktuellen Versuchsaufbau unterschätzt werden, da die Oberflächenspannung zwischen der Hydrogeloberfläche und der Glassubstratoberfläche einen größeren Einfluss hat als zwischen den Hydrogelen allein. Außerdem müssen bei der Untersuchung von Strukturen mit höheren Schichtdicken zusätzliche Kräfte wie die Schwerkraft stärker berücksichtigt werden. Bei zukünftigen Weiterentwicklungen dieses Versuchsaufbaus sollten diese Faktoren in das Design einbezogen werden, um eine noch genauere Untersuchung der Fließeigenschaften von Hydrogelen zu ermöglichen. Dies könnte beispielsweise durch eine Adaption des Filament-Collapse-Tests erreicht werden. Durch eine automatisierte und zeitaufgelöste Erfassung des Auslenkwinkels ähnlich dem hier vorgestellten Aufbau können Korrelationen mit den Modellparametern der rheologischen Daten durchgeführt werden.

Darüber hinaus spielen beim 3D-Druck von Biotinten auch Prozessparameter wie Kanülenform und -durchmesser, Abstand der Kanüle zum Druckbett, Druckgeschwindigkeit und der verwendete Extrusionsdruck eine Rolle, insbesondere im Hinblick auf das Überleben der eingebetteten Zellen. So beschreiben Blaser et al. für den Druck von Hydrogelen aus Alginate mit L929 und hMSC-Zellen einen kritischen Extrusionsdruck von 5-10 kPa, oberhalb dessen die Zellviabilität von über 96 % auf 76 % sinkt.[203] In anderen Publikationen werden jedoch auch bei höheren Drücken noch sehr gute Zellviabilitäten dokumentiert. He et al. verwenden Drücke von 15-30 kPa für die Extrusion von Alginate/Gelatine-Hydrogelen mit L929-Mausfibroblasten und erreichen damit 92 % Zellviabilität direkt nach dem Druck.[194] Ähnliches gilt für die Studie von Lechner et al.[208], hier zeigen humane BxPC-3 Pankreaszellen bei Drücken von 40 kPa in Hydrogelen aus eADF4(C16) eine Zellviabilität von 85 % nach dem Druck. Deutlich höhere Drücke von bis zu 220 kPa wurden von Ribeiro et al.[182] und Hu et al.[183] beschrieben, allerdings wurde in diesen Versuchen nur die optimale Druckbarkeit der entwickelten Tinten ohne Integration von Zellen untersucht. Bei der Entwicklung des Biodruckverfahrens und der Tinten muss daher immer auch der Einfluss der einzelnen Parameter im Hinblick auf das Zellverhalten berücksichtigt werden. Im Folgenden wird daher die Wechselwirkung der in Faserform eingebrachten Additive mit den Zellen näher betrachtet.

## 4.3 Einfluss von Fasereigenschaften auf die Interaktion mit Zellen

In diesem Teil wird der Einfluss verschiedener Fasereigenschaften auf die Interaktion zwischen Fasern und Zellen dargestellt und ein Modell präsentiert, das eine Erklärung für die besonderen biofunktionalen Eigenschaften der hantelförmigen Faserfragmente bietet.

Die Interaktion von Zellen mit ihrer Umgebung findet immer zuerst über die Oberflächen statt. Neben den (bio-)chemischen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Oberflächenadhäsion, spielen die geometrischen Umgebungsbedingungen eine entscheidende Rolle in der Reifung der Adhäsion und der Zellmigration. Im Folgenden wird daher ein Überblick über den Einfluss verschiedener Fasereigenschaften (Abb. 4.19) auf die Zellinteraktion gegeben, wobei der Schwerpunkt auf Material und Geometrie liegt.



**Abbildung 4.19:** Darstellung von Fasereigenschaften die nachweisbaren Einfluss auf die Zellinteraktion und das langfristige Zellverhalten ausüben.

### 4.3.1 Faserdurchmesser

Der Faserdurchmesser ist ein offensichtlicher Einflussfaktor auf die Fasereigenschaften. Zahlreiche Studien haben sich bereits mit dem Einfluss von Faserdurchmessern auf Zellinteraktionen beschäftigt und konnten Effekte in verschiedenen Zelltypen wie Chondrozyten [213], mesenchymalen Vorläuferzellen [214] und neuronalen Stammzellen [215] identifizieren. Diese Erkenntnisse bilden den Ausgangspunkt für die Entwicklung des Fasersystems mit definiertem Durchmesser in dieser Arbeit.

Abagnale et al. [216] zeigen, dass mit Hilfe des Faserdurchmessers ganz spezifisch die Zelldifferenzierung beeinflusst werden kann. hASCs, die auf Nanofasern mit 650 nm Durchmesser angesiedelt werden, zeigen keine Differenzierung oder Hochregulierung von Diffe-

renzierungsmarkern, während die Ansiedelung auf 2  $\mu\text{m}$  Fasern zum Einleiten der Osteogenese führt. Fasern mit noch größeren Durchmessern von 15  $\mu\text{m}$  wiederum führen zur Adipogenese in den Zellen. Im Kontrast dazu zeigen hMSCs nur auf den Nanofasern eine Expression von Markern für die Osteogenese.[217] Die Studie von Rose et al. definiert einen Durchmesser von 2,5  $\mu\text{m}$  als ideal für die Ausbildung von neuronalen Fortsätzen und bestätigt damit das Potenzial der hier beschriebenen PCL-Fasern.[218] Diese Beispiele verdeutlichen bereits die Komplexität der Interaktionsmechanismen und die starke Abhängigkeit vom untersuchten Zelltyp bei der Bewertung des Experiments.

Dabei spielt nicht nur der absolute Durchmesser eine wichtige Rolle, dieser muss auch ins Verhältnis zur Größe der untersuchten Zellart gesetzt werden. Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.3.2 zeigen einen deutlichen Unterschied in der Viabilität und Morphologie von BALB/3T3-Zellen und humanen BJ-Fibroblasten, die auf denselben Faserfragmenten angesiedelt wurden. So zeigen die größeren BJ-Fibroblasten eine starke Ausrichtung des Zellkörpers entlang der Faserachse und der Möglichkeit darüber hinaus Abstände zu überbrücken um mehrere Faserfragmente zu überspannen. Eine Betrachtung der Literatur mit Fokus auf die Morphologie der angesiedelten Zellen zeigt, dass unter anderem MSCs [214] und Tendinozyten [219] stärkere Elongation, höhere Aspekt Verhältnisse, effektivere Ausrichtung und größere Zelloberflächen auf Mikrofasern (1-4  $\mu\text{m}$ ) im Vergleich zu Nanofasern (40-700 nm) aufweisen, weshalb in dieser Arbeit der Fokus auf die Herstellung von Mikrofasern gelegt wurde.[220] Dieser Punkt wird weiter gestärkt durch die Beobachtung von Yim et al., dass sich Kollagen-1 Fibrillen in der ECM bevorzugt zu Faserbündeln mit Durchmessern im Bereich von 1-3  $\mu\text{m}$  anlagern.[221] Für die untersuchten BJ-Fibroblasten sind darüber hinaus keine großen Aspektverhältnisse der einzelnen Faserfragmente nötig, um eine Elongation des Zellkörpers zu initiieren, jedoch ist eine effektive Ausrichtung der einzelnen Fragmente wichtig, da sich die Zellen stark an der Faserachse orientieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen weiter, dass die kleineren BALB/3T3-Zellen entweder auf Fasern mit geringerem Durchmesser angewiesen sind oder ein größeres Aspektverhältnis benötigen. Vergleichbare Studien ebenfalls an BALB/3T3-Mausfibroblasten von Leal-Egana et al. [81] haben darüber hinaus demonstriert, dass graduell ansteigende Faserdurchmesser von 150 nm bis 680 nm zu einem Anstieg von Zelladhäsion und Proliferationsrate, sowie einer Verkürzung der Verdopplungszeit führen können. Die dazu untersuchten Vliese aus elektrogesponnenem Spinnenseidenprotein führen zu einer deutlichen Verbesserung der Zell-Matrix Aktivität im Vergleich zu Filmen und Hydrogelen aus demselben Material. Rein auf die Adhäsion beschränkt, zeigen unterschiedliche Zelltypen wie Fibroblasten [222], Tendinozyten [223], hASCs [216] und hMSCs [217] größere Fokale Adhäsionen auf Mikrofasern als auf Nanofasern. Im Falle von humanen dermalen Fibroblasten wird von Hsia et al. eine geringere Anzahl, aber dafür größere Fokale Adhäsionen nachgewiesen.[222] Dies geht einher mit einer Steigerung der F-Aktin Expression, was zu

einer Verstärkung der Aktin Organisation des Zytoskeletts führt. Da BALB/3T3-Zellen nicht die Möglichkeit haben mehrere Faserstücke zu überbrücken, kann angenommen werden, dass sie sich stattdessen auf der Oberfläche einzelner Fasern vermehren und auf diesen abhängig von der Oberfläche, wie von Ge et al. [224] beschrieben, migrieren. Daher benötigt dieser Zelltyp vermutlich eine größere zusammenhängende Oberfläche, an der sich die einzelnen Zellen orientieren können. Nach diesen Ergebnissen werden die hier vorgestellten PCL-Fragmente mit Durchmessern im unteren Mikrometerbereich entwickelt, um eine möglichst breite Plattform für unterschiedliche Zellarten zu bieten.

Die in Abschnitt 3.3.4 vorgestellten Ergebnisse zur starken Migration von FUCCI-Reporterzellen auf ausgerichteten PCL-Mikrofasern stimmen darüber hinaus mit den Hypothesen von Chaurey et al. [220], Binder et al. [225] und Wang et al. [226] überein, welche zeigen können, dass die untersuchten Zellen im Schnitt auf Nanofasern höhere Geschwindigkeiten erreichen, dafür auf Mikrofasern aber größere Distanzen zurückgelegt werden können. Dies spricht dafür, dass durch die Verwendung von PCL-Mikrofasern, anstelle von häufig verwendeten Nanofasern, die Mobilität der eingebetteten Zellen im Hydrogel verbessert werden kann.

### **4.3.2 Zeitlicher Einfluss**

Zusätzlich verändert sich der Einfluss des Durchmessers auf die Zellinteraktion in den meisten Fällen über den Beobachtungszeitraum. In dieser Arbeit wird die zeitliche Entwicklung der Zell-Faser-Interaktion von Tumorzellen über drei Tage beobachtet. Experimente mit U87-Glioblastomzellen und Faserfragmenten in Nährmedium zeigen die aktive Assemblierung der Fragmente durch die Zellen während des Beobachtungszeitraums. In Zeitrafferaufnahmen kann beobachtet werden, wie die Zellen durch das Medium wandern, bis sie mit einer Faser in Kontakt kommen und aktiv daran anhaften. Diese Form der aktiven Migration und wiederholten Adhäsion wird ebenfalls von Rakesh et al. beobachtet.[227] Sie untersuchen dabei die Interaktion von Fibroblasten mit PCL-Fasern im Durchmesserbereich von 3-5  $\mu\text{m}$  und können aktive Bewegungen der Zellen in Richtung der Fasern mit wiederholtem Anhaften und Loslösen über einen Zeitraum von 24 Stunden dokumentieren. Darüber hinaus kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in Folge der Adhäsion, eine Zellbewegung zusammen mit den Faserfragmenten stattfindet, bis weitere Zellen oder Fasern in das Agglomerat aufgenommen werden. In den daraus entstehenden dichten Faserstrukturen ist eine hohe Zelldichte erkennbar, die Ähnlichkeiten mit der Ausbildung von Sphroiden nach Burdis et al. aufweisen.[228]

Im Verlauf des Experiments wird wie bei Rasekh et al. wiederholt beobachtet, wie sich einzelne Zellen aus diesem Verbund lösen und neue Fasern als Adhäsionselement finden.

Mit stärkerem Fokus auf die Zellproliferation zeigen English et al. [219] für den Fall der Tenogenese, dass an Tag 1 des Experiments 2  $\mu\text{m}$  Fasern zur Hochregulierung der entsprechenden Gene führen. An Tag 5 jedoch die Zellen auf 37 nm und 317 nm Fasern eine stärkere Expression der mit der Ausbildung von Sehnen assoziierten Gene aufweisen. Die Proteine Kollagen Typ I, III, V sowie Tenomodulin werden auf Mikrofasern stärker exprimiert als auf Nanofasern, was zeigt, wie wichtig die gleichzeitige Betrachtung von Protein- und Genexpression neben der reinen Morphologie für die Bewertung ist.[223] Da in dieser Arbeit nur die Morphologie betrachtet wird und Proliferationseffekte nicht dargestellt werden können, wird vorgeschlagen, ähnliche zeitabhängige Analysemethoden, wie sie von Lee et al. vorgestellt wurden, in zukünftigen Ansätzen zur Bewertung von Biotinten mit unterschiedlichen Additiven zu verwenden.[223] Ergänzend können diese einen erheblichen Mehrwert in der Beurteilung des Zellverhaltens bieten. In Zukunft könnte das beschriebene Verhalten aus Adhäsion und Selbstorganisation für die Herstellung von Zellsphäroiden eingesetzt werden. Diese sind aufgrund ihrer hohen Zelldichte attraktiv für den Biodruck mittels tropfenbasierter Druckverfahren und stehen aktuell als Alternative zur Verwendung von Biotinten mit vereinzelt Zellen in der Diskussion.[228]

### **4.3.3 Faserform**

Neben dem Durchmesser können weitere morphologische Parameter der Fasern das Zellverhalten beeinflussen. So demonstriert die Arbeit von Yang et al. [229], dass die Modifikation der Oberflächenstruktur, von glatten PCL-Fasern zu einer „Shish Kebab“-Struktur, einen positiven Einfluss auf die Zelladhäsion hat. Im direkten Vergleich mit einer klassischen Beschichtung mit dem Bindungsmotiv RGD, zeigen die Zellen auf den Fasern mit modifizierter Oberflächenstruktur eine stärkere Adhäsion, ausgeprägteres Spreiten und ein aktiveres Zytoskelett.[230] Dies zeigt, dass bereits die Oberflächenstruktur einen stärkeren Einfluss als eine Beschichtung mit dem Bindungsmotiv RGD auf das Zellverhalten haben kann. Für die hier vorgestellten hantelförmigen PCL-Faserfragmente werden ähnliche positive Einflüsse auf die Zellmorphologie und das Zellverhalten festgestellt. Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.3.4 zeigen die Attraktivität der Hantelform gegenüber glatten Endlosfasern. Die hier untersuchten U87-Reporterzellen, die auf ungeordneten Endlosfasern angesiedelt werden, tendieren dazu Cluster zu bilden und Kugelform anzunehmen, anstatt sich gleichmäßig auf der Oberfläche auszubreiten. Im Vergleich dazu zeigen Zellen, die auf einer Mischung aus kontinuierlichen und fragmentierten Fasern kultiviert werden, erkennbares Spreiten und eine großflächigere Besiedelung der Oberfläche. Dieses Verhalten lässt, wie von Yang et al. [229] und Wang et al. [230] beschrieben, auf eine erhöhte Anzahl an fokalen Adhäsionen zwischen Zellen und Faseroberfläche schließen.

Die besten Ergebnisse dieser Versuchsreihe liefern die Proben in denen U87-Reporterzellen auf einer Oberfläche nur mit hantelförmigen Faserfragmenten kultiviert werden. Hier ist das Spreitverhalten am ausgeprägtesten und die Oberflächenbesiedelung ist noch homogener als in den anderen Proben. Dies legt nahe, dass die Anzahl und spezielle Krümmung der abgerundeten Enden direkt mit der Ausbildung zusätzlicher Fokaler Adhäsionen in Verbindung steht, da in dieser Arbeit ein direkter Vergleich mit demselben Material, aber fließenden Übergängen in der Morphologie durchgeführt wird. Ähnliche Effekte werden auch von Omidinia-Anarkoli et al. beim Vergleich von glatten, gerillten und porösen Fasern beschrieben.[231] Die angesiedelten neuronalen Zellen zeigen auf den Fasern mit Oberflächenstruktur ein stärkeres Neuritenwachstum und eine stärkere Ausrichtung als auf komplett glatten Fasern mit durchgehend gleichem Durchmesser. Dieselben Ergebnisse werden ebenfalls für Fibroblasten bestätigt, wobei die höchsten Aspektverhältnisse der untersuchten Zellen auf gerillten Fasern gemessen werden.[232]

Eine detaillierte Untersuchung dieses Verhaltens mit Hilfe der immunozytochemischen Färbung von F-Aktin zeigt die Ausbildung von robusten F-Aktin gestützten Protrusionen der Zellen entlang der Fragmente. Diese Formen der Zelladhäsion werden durch Integrin moderierte Ausbildung von Fokalen Adhäsionen gesteuert und führen zu ausgeprägtem Spreiten und Zellmigration. Zellen, die in derselben Probe in Bereichen von kontinuierlichen Fasern kultiviert werden, sind in der Morphologie ihres Zytoskeletts deutlich stärker abgerundet und zeigen eine Vielzahl an kleinen und unausgerichteten filopodialen Fortsätzen. Dies kann auf eine verminderte Zell-Faser Adhäsion zurückgeführt werden, was zu einer weniger gerichteten Integrin Antwort und unvollständigen Ausbildung von fokalen Adhäsionen führt. Des Weiteren beschreibt Gingras et al. [233] einen Mechanismus, bei dem physikalische Kräfte, die zu einer Änderung der Membranstruktur führen, in der Lage sind eine Talin unabhängige Integrinaktivierung auszulösen. Diese Aussagen werden auch von Li et al. [234] gestützt, in deren Untersuchungen die Affinität für Ligandenbindung von Integrin und der nachgeschalteten Signalkaskade allein über eine Anpassung der Oberflächenkrümmung und einer damit verbundenen Konformationsänderung gesteigert wird.

In Bereichen der hantelförmigen Faserfragmente wird zudem deutlich, dass Zellen in den meisten Fällen mehrfache Interaktionen speziell im Bereich der abgerundeten Enden der Fasern etablieren. Messbar wird dies durch die hohe Fluoreszenz Intensität des F-Aktin in diesen Bereichen. Wie in Studien von Yamashita et al. [235] und auch Kim et al. [236] bereits beschrieben, kann davon ausgegangen werden, dass insbesondere die Krümmung der Adhäsionsoberfläche Einfluss auf den Adhäsionsvorgang von Zellen auf Faseroberflächen hat. Dabei untersuchen Yamashita et al. das Wachstum von humanen glatten Muskelzellen der Aorta auf Glassubstraten mit definierten Gräben im Mikrometerbereich, wobei der Krümmungsradius der Oberfläche maßgeblich Einfluss auf die Ablösung des Zellverbun-

des nimmt.[235] Kim et al. präsentieren ein integratives Zellinteraktionsmodell mit dessen Hilfe die Dynamik von fokalen Adhäsionen auf unterschiedlich gekrümmten Oberflächen beschrieben wird.[236] Ihr Modell zeigt, dass die Migrationsgeschwindigkeit von Zellen abhängig von der Querschnittsfläche, und damit von der Krümmung, einer zylindrischen Oberfläche ist und abhängig von der Zellart ein Maximum bei einem definierten Durchmesser erreichen kann. Darüber hinaus tendieren Zellen bei größeren Krümmungsradien von mehr als 30  $\mu\text{m}$  tangential auf der Oberfläche zu migrieren, während sie bei kleineren Durchmessern (unter 15  $\mu\text{m}$ ) verstärkt longitudinal wandern. In diesem Bereich befinden sich die hier vorgestellten Mikrofasern, es kann daher davon ausgegangen werden, dass sie sich zur Steuerung der Migration von Zellen entlang der Faserachse eignen.

Ein weiterer Vorteil der Hantelform könnte bei der Verteilung der Scherkräfte während des Extrusionsdrucks eine Rolle spielen. Wenn die Fasern während des Extrusionsprozesses aufgrund der Scherströmung mit erhöhter Relativgeschwindigkeit auf die suspendierten Zellen treffen, sind verdickte, abgerundete Enden mit größerem Durchmesser von Vorteil, da die kinetische Energie des Aufpralls auf eine größere Fläche verteilt werden kann. Die abgerundeten Enden der hier vorgestellten Faserfragmente sind daher potenziell zellschonender in der Verarbeitung, da das Risiko der Penetration der Zellmembran im Gegensatz zu scharfen Kanten oder spitzen Fragmenten, wie sie nach der Herstellung durch einen Schneid- oder Bruchvorgang entstehen würden, reduziert ist. Untersuchungen von Angle et al. zur Geometrie und Oberflächenchemie von Zellpenetrierenden AFM-Spitzen zeigen, dass die Geometrie, der alles dominierende Faktor in dieser Frage ist, wobei spitz zulaufende Objekte deutlich weniger Kraft benötigen, um die Zellmembran zu durchstoßen.[237]

#### **4.3.4 Faserausrichtung**

Abgesehen von der Morphologie der Fasern, spielt die Ausrichtung dieser zueinander ebenfalls eine Rolle. In bestimmten Zelltypen wie hMSCs, kann die Ausrichtung der Fasern im Substrat darüber entscheiden, ob die Kardiomyogenese eingeleitet wird oder ausbleibt.[238, 239] Für andere Zelltypen wie ACL Fibroblasten [240], HUVECs [241] oder hiPSCs [242] ist der Effekt der Orientierung auf die Differenzierung jedoch weniger entscheidend. Besser dokumentiert ist der Einfluss jedoch auf die Zellmorphologie. Zellen, die auf ausgerichteten Fasern kultiviert werden, sind nach Jenkins et al. in der Regel elongiert oder spindelförmig mit einer Orientierung entlang der Faserachse.[83]

Diese bekannten Effekte können auch in dieser Arbeit in den im Abschnitt 3.3.2 vorgestellten Experimenten bestätigt werden. So zeigen die untersuchten U87-Reporterzellen nach der Besiedlung auf ausgerichteten Endlosfasern eine deutlich verlängerte Zellmorphologie entlang der Faserachse im Gegensatz zur Kugelform auf zufällig orientierten Fasern.

Zellen, die auf einer Mischung aus ausgerichteten Fasern und ausgerichteten Fragmenten kultiviert wurden, zeigen neben der Elongation bereits ein deutlich ausgeprägtes Spreitverhalten.

Verantwortlich dafür ist vermutlich das F-Aktin, welches sich nach Whited et al. verstärkt entlang der freien Grenzfläche auf der Oberfläche der Faser bildet und für eine vergrößerte Kontaktfläche des Zytoplasmas sorgt.[243] Ergänzend zeigt Li et al. für HUVECs, dass sich diese auf Mikrofasern besser ausrichten können als auf Nanofasern, da eine größere Fläche für Zell-Faser Interaktion zur Verfügung steht.[244] Zudem wird von Lee et al. für Zellen auf ausgerichteten Fasern stärkere Expression der Bindungsproteine Vinculin und Paxillin nachgewiesen, was für eine stärker ausgeprägte Adhäsion spricht.[223] Im Gegensatz dazu sind Zellen, die auf Faserunterlagen ohne gezielte Ausrichtung kultiviert werden, typischerweise kugelförmig und formen Cluster, wobei sie selbst keine bevorzugte Wachstumsrichtung zeigen, was mit den vorgestellten Ergebnissen übereinstimmt.[83]

Weitere Versuche mit derselben Zellart unter Abschnitt 3.3.4 zeigen außerdem die effektive Steuerung der Zellmigration durch Faserausrichtung. Zellen, die initial in einem lokalisierten Bereich im Zentrum der Probe platziert wurden, zeigen eine gleichmäßige Migration in alle Richtungen über ein Vlies ohne Ausrichtung der Faserfragmente und eine homogene Besiedelung desselben. Im Gegensatz dazu weist die Probe mit ausgerichteten Faserfragmenten eine ausgeprägte Ausrichtung und Migration der Zellen entlang der primären Faserachse auf. Nach drei Tagen befinden sich die Zellen ausschließlich in den Randbereichen in Faserrichtung, während im zentralen Bereich der ursprünglichen Ansiedlung keine Zellen mehr nachweisbar sind.

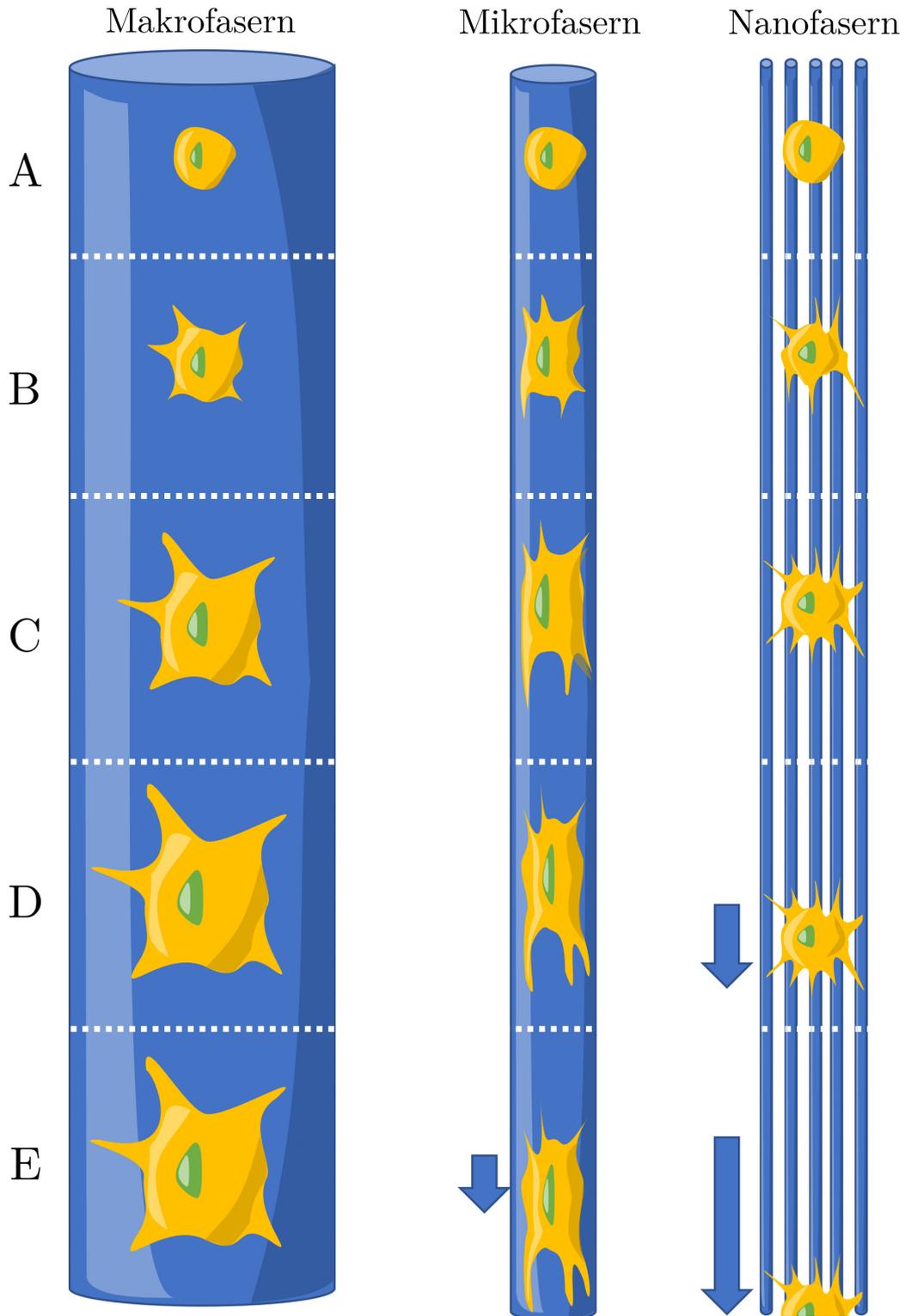
Damit sind diese Ergebnisse in Übereinstimmung mit großen Teilen der Literatur. So ermittelt Sundararaghavan et al. ebenfalls für andere Zelltypen, dass die Faserausrichtung die Zellmigration stärker beeinflusst als chemotaktische Gradienten.[245] In Bezug auf die Zellmobilität wird in mehreren Studien nachgewiesen, dass hMSCs [246], 3T3-Fibroblasten [247], Glioblastoma-Zellen [248], oder Fibrosarkom-Zellen [249] auf ausgerichteten Fasern schneller und weiter migrieren können als auf zufällig orientierten Fasern. Dabei korreliert die Geschwindigkeit der Zellen direkt mit dem Grad an Ausrichtung des Substrates.[250] Qin et al. [251] zeigen beispielsweise, dass die Migrationsgeschwindigkeit von adulten dermalen Fibroblasten stark von der Topografie der Umgebung abhängig ist. Während die Migrationsgeschwindigkeit auf dünnen Filmen initial höher als auf Fasern ist (Film: 50  $\mu\text{m}/\text{h}$ , Fasern: 32  $\mu\text{m}/\text{h}$ ), nimmt sie auf den Filmen im Verlauf von 24 Stunden ab und bleibt bis Tag 7 auf einem konstant niedrigen Niveau (30  $\mu\text{m}/\text{h}$ ). Im Gegensatz dazu zeigen dieselben Zellen auf ausgerichteten Fasern zu Beginn eine niedrige Geschwindigkeit (32  $\mu\text{m}/\text{h}$ ), die sich im Verlauf von 4 Tagen jedoch mehr als verdoppelt (maximal 68,5  $\mu\text{m}/\text{h}$  an Tag 4) und damit die Initialgeschwindigkeit auf Filmen übertrifft.[251]

Diese Ergebnisse können nur bedingt mit den Versuchen der vorliegenden Arbeit verglichen werden, da hier nur ein Zeitpunkt aufgenommen wird. Für eine bessere Vergleichbarkeit und Analyse der Migrationsgeschwindigkeit sollten in Zukunft jedoch auch bei diesen Versuchen Aufnahmen in gleichmäßigen Zeitintervallen erfolgen. Dass für diese Effekte nicht unbedingt eine hohe Konzentration an Fasern nötig ist, wird von Vedarman et al. gezeigt.[252] Dabei werden Neuronen auf einer Oberfläche mit dünnen Stegen als Orientierungshilfen kultiviert und die Ausbildung und Ausrichtung ihrer neuronalen Fortsätze beobachtet. Es wird gezeigt, dass eine deutliche Vergrößerung der Abstände der Orientierungshilfen, sowohl in vertikaler von 2  $\mu\text{m}$  auf 20  $\mu\text{m}$ , als auch in horizontaler Richtung von 20  $\mu\text{m}$  auf 100  $\mu\text{m}$ , immer noch einen stark orientierenden Effekt auf die Neuronen ausübt. Ähnliche Effekte werden auch in der Studie von Rose et al. beobachtet, bei der geringe Hydrogelfaserkonzentrationen von 1-2% w/v immer noch zu einer starken Ausrichtung der untersuchten Mausfibroblasten und primärdorsalen Wurzelganglien vom Huhn führen.[218] Basierend auf der optischen Analyse in dieser Studie ist anzunehmen, dass die PCL-Faserfragmente im untersuchten Konzentrationsbereich von 2-10% w/v mit einem mittleren Faserabstand von 10  $\mu\text{m}$  bis 30  $\mu\text{m}$  im Hydrogel vorliegen und damit ebenfalls Einfluss auf die Zellorientierung ausüben.

#### **4.3.5 Modell zum Einfluss der Oberflächenkrümmung auf Zelladhäsionsvorgänge**

Diese beobachtbaren Einflüsse von Durchmesser, Morphologie und Ausrichtung von Fasern und Fragment auf das Zellverhalten bilden zusammen mit der bereits in Abschnitt 1.8 beschriebenen bidirektionalen Funktionsweise der Integrinbindung, das hier vorgestellte Modell für die Zellinteraktion hantelförmiger Faserfragmente (Abb. 4.20).

In der beschriebenen bidirektionalen Signalübertragung tragen nach Hynes et al. neben den biochemischen Reaktionen auch mechanische Signale zur Ausbildung und Verstärkung der Integrinaktivität bei.[253] Bei einer Betrachtung unterschiedlich geformter Flächen gleichen Materials, kann also davon ausgegangen werden, dass die mechanische Komponente den entscheidenden Unterschied ausmacht. Es werden zunächst die beiden Extremfälle, sehr großer und sehr kleiner Faserdurchmesser, jeweils im Verhältnis zur Zelle, betrachtet.



**Abbildung 4.20:** Schematische Darstellung der Besiedelung von Makrofasern, Mikrofasern und Nanofasern durch Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. A: Ansiedeln von Zellen. B: Ausbildung der ersten fokalen Adhäsionen. C: Reifung der fokalen Adhäsionen auf Makro- und Mikrofasern, erhöhte Anzahl kleiner Adhäsionen auf Nanofasern. D: Spreiten der Zelle auf Makrofaser, Elongation auf Mikrofaser und Beginn der Migration auf Nanofaser. E: Gespreitete Zelle auf Makrofaser, elongierte Zelle wandert auf Mikrofaser und kugelförmige Zelle wandert mit hoher Geschwindigkeit auf Nanofasern.

Aus Zellperspektive erscheinen sehr große Faserdurchmesser (größer  $1000\ \mu\text{m}$ ) eher wie eine Ebene (Abb. 4.20-Makrofasern). Es steht genug Fläche zur Verfügung, um beliebig viele fokale Adhäsionen auszubilden und diese bis zur maximalen Größe reifen zu lassen. Dabei gibt es weder in Bezug auf Größe oder Richtung der Ausbildung von Adhäsionen eine geometrische Beschränkung. In der Folge reifen die initialen Adhäsionspunkte ohne eine definierte Vorzugsrichtung, die Zellen wachsen gleichmäßig und zeigen sehr ausgeprägtes Spreitverhalten mit geringer Migrationsgeschwindigkeit.

Im Gegensatz dazu bieten sehr kleine Faserdurchmesser (kleiner  $100\ \text{nm}$ ) nur eine stark begrenzte Fläche für die Ausbildung der initialen fokalen Adhäsionen (Abb. 4.20-Nanofasern). Diese primären Adhäsionspunkte haben nach Kim et al. eine durchschnittliche Fläche von  $0,25\ \mu\text{m}^2$ , was einem Quadrat mit Kantenlänge  $500\ \text{nm}$  entspricht.[236] Fasern mit einem Umfang kleiner als die theoretische Kantenlänge einer einzelnen primären Adhäsion erschweren diesen ersten Kontakt bereits enorm. Auch bei einer erfolgreichen Ausbildung einer initialen fokalen Adhäsion ist der Platz für weiteres Wachstum und Stabilisierung dieser stark eingeschränkt. Dies hat zur Folge, dass Zellen in der Umgebung von Nanofasern versuchen mit einer Vielzahl von Fasern gleichzeitig zu interagieren, um damit in Summe eine vergleichbare Stabilität für eine gerichtete Migration zu erreichen. Diese Vielzahl an kleineren Protrusionen, ohne die vollständige Reifung der einzelnen fokalen Adhäsionen, führt nach Noriega et al. zu einer reduzierten Fähigkeit des Spreitens und damit zu einer deutlich runderen Zellmorphologie.[213] Andererseits ermöglicht der schnellere Auf- und Abbau kleinerer Protrusionen eine höhere Migrationsgeschwindigkeit der einzelnen Zellen, da zwar eine höhere Anzahl, aber dafür weniger stark ausgeprägte Bindungen wieder aufgelöst werden müssen.

Liegt der Durchmesser der Fasern in der Größenordnung von Zellen (zwischen  $1\ \mu\text{m}$  und  $100\ \mu\text{m}$ ), dann stellt die Faseroberfläche genug Platz für die Ausbildung einer initialen fokalen Adhäsion zur Verfügung (Abb. 4.20-Mikrofasern).[236] Während der Reifung der Adhäsion wächst auch die Kontaktfläche bis auf mehrere  $\mu\text{m}$  in der Länge und Breite an. Durch die Krümmung der Faseroberfläche kann das Wachstum der Adhäsionsfläche jedoch nicht gleichmäßig erfolgen, sondern passt sich an die vorgegebene Geometrie an und muss daher größere Distanzen überbrücken als in der Ebene. Diese Dehnung der fokalen Adhäsionen verursacht Zugspannungen, welche durch die Zellmembran an das Aktinskelett übertragen werden und nach Kechagia et al. als mechanisches Signal in der Zelle zu einer verstärkten Aktivierung der Integrine anregen.[254] Da für die Ausbildung weiterer fokaler Adhäsionen nur begrenzter Platz zur Verfügung steht, müssen diese weiter entlang der Faserachse positioniert werden. Dadurch entsteht erneut Zugspannung auf das Aktinskelett, was zur Integrinaktivierung führt. Dieser Rückkopplungsmechanismus initiiert die Elongation der Zellen in Richtung der Faserachse und treibt die Migration in dieser Richtung voran.

Im Fall der hantelförmigen Fragmente kommt eine weitere Komponente hinzu. Durch die abgerundeten Enden entsteht ein gradueller Übergang mit konstanter Krümmung, und daraus folgend ein stetig wachsendes Potenzial an Zugspannung, was zu einer starken Interaktion der Zellen mit der Faser führt. Dies ist eine Erklärung für die hohe Intensität der Aktinfärbung gerade im Bereich der abgerundeten Enden.[255] Bei harten Bruchkanten mit abrupten Winkeländerungen von bis zu 90 Grad fehlt dieser sanfte Gradient. Es wird daher vermutet, dass diese Geometrien weniger geeignet sind, um eine gleichmäßige Ausbildung von fokalen Adhäsionen zu ermöglichen. Da sich die verschiedenen Zelltypen in ihrer Größe stark unterscheiden, kann davon ausgegangen werden, dass es für jeden Zelltyp einen optimalen Krümmungsgrad (und damit Faserdurchmesser) gibt. An diesem Punkt können sich stabile fokale Adhäsionen mit hoher Zugspannung ausbilden, die gleichzeitig eine kontinuierliche Migration mit hoher Geschwindigkeit ermöglichen. Fasern mit Durchmessern im unteren Grenzbereich geben stärkere mechanische Impulse, was zu einer höheren Migrationsgeschwindigkeit führt. Im oberen Grenzbereich des Faserdurchmessers bilden sich stabilere Oberflächenbindungen aus und die Zellen zeigen ein ausgeprägteres Spreitverhalten.

### **4.3.6 Materialeigenschaften**

Neben diesen morphologischen Einflüssen bringt auch das Material selbst Eigenschaften in die Zell-Faser-Interaktion ein. Für die Materialauswahl gilt generell, dass die mechanischen Eigenschaften des Substratmaterials, wie Steifigkeit und Dehnbarkeit, jeweils sehr spezifisch an die Anforderungen der verschiedenen Gewebearten, wie Knorpel [256], Bänder [257] oder dem Sehnen-Knochen-Übergang [258], angepasst werden müssen.

Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Untersuchung von PCL liegt, werden dessen Eigenschaften hinsichtlich Mechanik, Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit hier vorausgesetzt. Da unmodifiziertes PCL grundsätzlich ein hydrophobes Material ohne funktionelle Oberflächengruppen für die Zelladhäsion ist, wird der Einfluss von unterschiedlichen Beschichtungen auf die Zellinteraktion getestet. Eine Studie von Babu et al. zeigt, dass die Verwendung von ECM-Proteinen auf der Oberfläche von Mikrogelfasern zwar die Ausrichtung neuronaler Fortsätze stört, aber insgesamt zu einem stärkeren Wachstum und einer größeren Ausdehnung dieser Fortsätze führt.[259]

Im Vergleich zwischen Plasmabehandlung, Fibronectin- und Kollagenbeschichtung zu unbeschichtetem PCL fällt zunächst die deutliche Reduktion der Oberflächenhydrophobizität auf (Abschnitt 3.3.1). Nach Besiedlung der unterschiedlich beschichteten Vliese mit BALB/3T3-Zellen und Auswertung der Lebend-/Tot-Färbung zeigen die mit Kollagen und Fibronectin beschichteten Fasern eine deutlich erhöhte Zellviabilität. Die reine Modi-

fizierung der Hydrophobizität durch Plasmabehandlung wirkt sich jedoch nur geringfügig auf die Verbesserung des Zellüberlebens aus. In den Studien von Yu et al. [260] und Yildirim et al. [261] wird dahingehend festgestellt, dass hydrophil modifizierte Oberflächen bereits die Zelladhäsion begünstigen und die Expression der fokalen Adhäsionsproteine Talin und Paxillin steigern. In den hier vorgestellten Ergebnissen wird allerdings deutlich, dass übereinstimmend mit Babu et al., vor allem das Einbringen biofunktioneller Oberflächengruppen durch Fibronectin und Kollagen die Zelladhäsion und Proliferation in einem Maß ermöglicht, welches nicht allein auf eine Änderung der Hydrophobizität zurückzuführen ist.[259]

Zusammenfassend können die hier vorgestellten Ergebnissen einige bereits bekannte Prinzipien bestätigen, aber auch neue Effekte der Zell-Faser-Interaktion beschreiben. Die nachfolgenden Aspekte beziehen sich ausschließlich auf die untersuchten Zelltypen und PCL als Fasermaterial. Sie dienen der Vereinfachung der gesammelten Erkenntnisse aus den vorgestellten Experimenten, um grundlegende Trends aufzuzeigen:

- Bei der Auswahl zwischen Oberflächen mit gleicher Attraktivität für die Adhäsion präferieren die untersuchten Zelltypen die Fasermorphologie von hantelförmigen PCL-Mikrofaserfragmenten gegenüber einer planaren Oberfläche.
- An diesen Faserfragmenten adhärierte BJ-Fibroblasten zeigen eine starke Ausrichtung entlang der Faserachse und können Distanzen von mehreren Mikrometern überspannen, um das nächste Fragment zu erreichen.
- FUCCI-Reporterzellen, kultiviert auf kontinuierlichen Fasern und hantelförmigen Fragmenten aus PCL, zeigen auf den Fragmenten deutlich ausgeprägteres Spreitverhalten und eine homogenere Oberflächenbesiedelung.
- F-Aktin Färbungen zeigen eine fokussierte Ausbildung multipler fokaler Adhäsionen an den abgerundeten Enden der Fragmente durch starke Integrinbindung.
- Ausgerichtete Fasern und Fragmente führen zu einer stärkeren Elongation des adhären Zellkörpers entlang der Faserachse und zu einer gerichteten Migration.
- Im freien Medium verfügbare PCL-Faserfragmente können von Zellen als Baumaterial für den Aufbau selbst-aggregierender Strukturen genutzt werden.

# Literaturverzeichnis

- [1] Deutscher Bundestag Pressestelle. Organspenden: Mehrheit für die Entscheidungslösung. *Deutscher Bundestag*, 2020.
- [2] BZgA. Wissen, einstellung und verhalten der allgemeinbevölkerung (14 bis 75 jahre) zur organ- und gewebspende; bundesweite repräsentativbefragung 2022. <https://www.organspende-info.de/>, 2022.
- [3] DSO. Jahresbericht zur organspende und transplantation in deutschland 2021. <https://www.dso.de>, 2021.
- [4] Amy Lewis, Angeliki Koukoura, Georgios-Ioannis Tsianos, Athanasios Apostolos Gargavanis, Anne Ahlmann Nielsen, and Efstathios Vassiliadis. Organ donation in the us and europe: The supply vs demand imbalance. *Transplantation reviews (Orlando, Fla.)*, 35:100585, April 2021.
- [5] Beatriz Domínguez-Gil. International figures on donation and transplantation 2020. *Newsletter Transplant, EDQM*, 26, 2021.
- [6] Lara Danziger-Isakov, Emily A. Blumberg, Oriol Manuel, and Martina Sester. Impact of covid-19 in solid organ transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 21:925–937, March 2021.
- [7] Branger and Vogelaar. Eurotransplant international foundation. *Annual Report*, 2021.
- [8] R. Matesanz, B. Domínguez-Gil, E. Coll, B. Mahillo, and R. Marazuela. How spain reached 40 deceased organ donors per million population. *American Journal of Transplantation*, 17(6):1447–1454, jan 2017.
- [9] May A. Hassaballa. Kidney paired donation. *Experimental and clinical transplantation : official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*, 20:59–61, August 2022.
- [10] Danielle N. Bozek, Ty B. Dunn, Christian S. Kuhr, Christopher L. Marsh, Jeffrey Rogers, Susan E. Rees, Laura Basagoitia, Robert J. Brunner, Alvin E. Roth, Obi Ekwenna, David E. Fumo, Kimberly D. Krawiec, Jonathan E. Kopke, Puneet Sindhwani, Jorge Ortiz, Miguel Tan, Siegfredo R. Paloyo, Jeffrey D. Punch, and Michael A. Rees. Complete chain of the first global kidney exchange transplant and 3-yr follow-up. *European urology focus*, 4:190–197, March 2018.
- [11] Scott Maier. Ucsf medical center, cpmc join forces for 18-patient kidney transplant chain. <https://www.ucsf.edu/news/2015/06/130276/ucsf-medical-center-cpmc-join-forces-18-patient-kidney-transplant-chain>, 2015.

- [12] Steve Walz. Historic 3-way kidney transplant between uae and israel. <https://www.shebaonline.org/first-dubai-israel-historic-kidney-donation-and-transplantation/>, 2021.
- [13] Ignazio R. Marino, Alvin E. Roth, and Michael A. Rees. Living kidney donor transplantation and global kidney exchange. *Experimental and clinical transplantation : official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*, 20:5–9, August 2022.
- [14] D. Bigam, R. Zhong, G. Levy, and D. Grant. Xenotransplantation. *Canadian journal of surgery. Journal canadien de chirurgie*, 42:12–16, February 1999.
- [15] K. H. Sim, A. Marinov, and G. A. Levy. Xenotransplantation: A potential solution to the critical organ donor shortage. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie*, 13:311–318, May 1999.
- [16] Robert L. Carithers. Liver transplantation: Will xenotransplantation be the answer to the donor organ shortage? *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 131:270–285, 2020.
- [17] Lars Burdorf, Christopher T. Laird, Donald G. Harris, Margaret R. Connolly, Zahra Habibabady, Emily Redding, Natalie A. O’Neill, Arielle Cimeno, Dawn Parsell, Carol Phelps, David Ayares, Agnes M. Azimzadeh, and Richard N. Pierson. Pig-to-baboon lung xenotransplantation: Extended survival with targeted genetic modifications and pharmacologic treatments. *American Journal of Transplantation*, 22(1):28–45, sep 2021.
- [18] Robert A. Montgomery, Sapna A. Mehta, Brendan Parent, and Adam Griesemer. Next steps for the xenotransplantation of pig organs into humans. *Nature medicine*, 28:1533–1536, August 2022.
- [19] Eugene Braunwald. Cardiac xenotransplantation: Another historic first? *JACC. Basic to translational science*, 7:743–744, July 2022.
- [20] Bartley P. Griffith, Corbin E. Goerlich, Avneesh K. Singh, Martine Rothblatt, Christine L. Lau, Aakash Shah, Marc Lorber, Alison Grazioli, Kapil K. Saharia, Susie N. Hong, Susan M. Joseph, David Ayares, and Muhammad M. Mohiuddin. Genetically modified porcine-to-human cardiac xenotransplantation. *The New England journal of medicine*, 387:35–44, July 2022.
- [21] Robert A. Montgomery, Jeffrey M. Stern, Bonnie E. Lonze, Vasishta S. Tatapudi, Massimo Mangiola, Ming Wu, Elaina Weldon, Nikki Lawson, Cecilia Deterville, Rebecca A. Dieter, Brigitte Sullivan, Gabriella Boulton, Brendan Parent, Greta Piper, Philip Sommer, Samantha Cawthon, Erin Duggan, David Ayares, Amy Dandro, Ana Fazio-Kroll, Maria Kokkinaki, Lars Burdorf, Marc Lorber, Jef D. Boeke, Harvey Pass, Brendan Keating, Adam Griesemer, Nicole M. Ali, Sapna A. Mehta, and Zoe A. Stewart. Results of two cases of pig-to-human kidney xenotransplantation. *New England Journal of Medicine*, 386(20):1889–1898, may 2022.
- [22] Paige M. Porrett, Babak J. Orandi, Vineeta Kumar, Julie Houp, Douglas Anderson, A. Cozette Killian, Vera Hauptfeld-Dolejssek, Dominique E. Martin, Sara Macedon, Natalie Budd, Katherine L. Stegner, Amy Dandro, Maria Kokkinaki, Kasinath V. Kuravi, Rhiannon D. Reed, Huma Fatima, John T. Killian, Gavin Baker, Jackson Perry, Emma D. Wright, Matthew D. Cheung, Elise N. Erman, Karl Kraebber, Tracy Gamblin, Linda Guy, James F. George, David Ayares, and Jayme E. Locke. First clinical-grade porcine kidney xenotransplant using a human decedent model. *American journal of transplantation :*

*official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 22:1037–1053, April 2022.

- [23] Muhammad M. Mohiuddin, Corbin E. Goerlich, Avneesh K. Singh, Tianshu Zhang, Ivan Tatarov, Bileta Lewis, Faith Sentz, Alena Hersfeld, Gheorghe Braileanu, Patrick Odonkor, Erik Strauss, Brittney Williams, Allen Burke, Jamie Hittman, Adnan Bhutta, Ali Tabatabai, Anuj Gupta, Todd Vaught, Lori Sorrells, Kasinath Kuravi, Amy Dandro, Will Eyestone, David J. Kaczorowski, David Ayares, and Bartley P. Griffith. Progressive genetic modifications of porcine cardiac xenografts extend survival to 9 months. *Xenotransplantation*, 29:e12744, May 2022.
- [24] Hayato Iwase, Suyapa Ball, Kent Adams, Will Eyestone, Anneke Walters, and David K. C. Cooper. Growth hormone receptor knockout: Relevance to xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 28(2), oct 2020.
- [25] Kasinath V. Kuravi, Lori T. Sorrells, Joseph R. Nellis, Farzana Rahman, Anneke H. Walters, Robert G. Matheny, Shailesh K. Choudhary, David L. Ayares, Scott P. Commins, John R. Bianchi, and Joseph W. Turek. Allergic response to medical products in patients with alpha-gal syndrome. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, April 2021.
- [26] Mayuko Kano, Eiji Mizutani, Shota Homma, Hideki Masaki, and Hiromitsu Nakauchi. Xenotransplantation and interspecies organogenesis: current status and issues. *Frontiers in endocrinology*, 13:963282, 2022.
- [27] R. Cortesini. Ethical aspects in xenotransplantation. *Transplantation proceedings*, 30:2463–2464, August 1998. 18 refs., KIE Bib: organ and tissue transplantation.
- [28] Jochen Sautermeister. Xenotransplantation from the perspective of moral theology. *Xenotransplantation*, 22:183–191, 2015.
- [29] Nezerith Cengiz and Christopher Simon Wareham. Ethical considerations in xenotransplantation: a review. *Current opinion in organ transplantation*, 25:483–488, October 2020.
- [30] Arthur Caplan and Brendan Parent. Ethics and the emerging use of pig organs for xenotransplantation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, June 2022.
- [31] Daniel J. Hurst and Luz A. Padilla. An ethical algorithm for xenotransplantation? further transparency and clarity needed. *Xenotransplantation*, 29:e12767, July 2022.
- [32] Patrick Odonkor, Erik Strauss, and Brittney Williams. Ethical considerations during a pioneering surgical procedure: porcine cardiac xenotransplantation. *British journal of hospital medicine (London, England : 2005)*, 83:1–7, June 2022.
- [33] Denys Montandon. Human-animal chimeras: New solution for organ xenotransplantation or ethical and metaphysical dilemma? *The Journal of craniofacial surgery*, August 2022.
- [34] David C. Cleveland, Abhijit Jagdale, Waldemar F. Carlo, Hayato Iwase, Jack Crawford, Gregory P. Walcott, Robert J. Dabal, Robert A. Sorabella, Leslie Rhodes, Joey Timpa, Silvio Litovsky, Carlisle O’Meara, Luz A. Padilla, Jeremy Foote, David Mauchley, Mohamed Bikheth, David Ayares, Takayuki Yamamoto, Hidetaka Hara, and David K. C. Cooper. The genetically engineered heart as a bridge to allotransplantation in infants just around the corner? *The Annals of thoracic surgery*, 114:536–544, August 2022.
- [35] C. Fred Fox. *Tissue engineering*. Liss, 1988.

- [36] Yoshito Ikada. Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society, Interface*, 3:589–601, October 2006.
- [37] J. Noordenbos, C. Doré, and J. F. Hansbrough. Safety and efficacy of transcyte for the treatment of partial-thickness burns. *The Journal of burn care and rehabilitation*, 20:275–281, 1999.
- [38] Jonathan Mansbridge. Tissue-engineered skin products. In *Principles of Tissue Engineering*, pages 1697–1715. Elsevier, 2014.
- [39] Ngan F. Huang, Vahid Serpooshan, Viola B. Morris, Nazish Sayed, Gaspard Pardon, Oscar J. Abilez, Karina H. Nakayama, Beth L. Pruitt, Sean M. Wu, Young-Sup Yoon, Jianyi Zhang, and Joseph C. Wu. Big bottlenecks in cardiovascular tissue engineering. *Communications biology*, 1:199, 2018.
- [40] Jürgen Groll, Thomas Boland, Torsten Blunk, Jason A Burdick, Dong-Woo Cho, Paul D Dalton, Brian Derby, Gabor Forgacs, Qing Li, Vladimir A Mironov, Lorenzo Moroni, Makoto Nakamura, Wenmiao Shu, Shoji Takeuchi, Giovanni Vozzi, Tim B F Woodfield, Tao Xu, James J Yoo, and Jos Malda. Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. *Biofabrication*, 8(1):013001, jan 2016.
- [41] Hemanth Gudapati, Madhuri Dey, and Ibrahim Ozbolat. A comprehensive review on droplet-based bioprinting: Past, present and future. *Biomaterials*, 102:20–42, sep 2016.
- [42] Katja Hözl, Shengmao Lin, Liesbeth Tytgat, Sandra Van Vlierberghe, Linxia Gu, and Aleksandr Ovsianikov. Bioink properties before, during and after 3d bioprinting. *Biofabrication*, 8(3):032002, sep 2016.
- [43] Xinda Li, Boxun Liu, Ben Pei, Jianwei Chen, Dezhi Zhou, Jiayi Peng, Xinzhi Zhang, Wang Jia, and Tao Xu. Inkjet bioprinting of biomaterials. *Chem. Rev.*, 120(19):10793–10833, October 2020.
- [44] Hamid Ebrahimi Orimi, Sayadeh Sara Hosseini Kolkoooh, Erika Hooker, Sivakumar Narayanswamy, Bruno Larrivé, and Christos Boutopoulos. Drop-on-demand cell bioprinting via laser induced side transfer (LIST). *Scientific Reports*, 10(1), jun 2020.
- [45] A.A. Antoshin, S.N. Churbanov, N.V. Minaev, Deying Zhang, Yuanyuan Zhang, A.I. Shpichka, and P.S. Timashev. LIFT-bioprinting, is it worth it? *Bioprinting*, 15:e00052, sep 2019.
- [46] Béla Hopp, Tomi Smausz, Norbert Kresz, Norbert Barna, Zsolt Bor, Lajos Kolozsvári, Douglas B. Chrisey, András Szabó, and Antal Nógrádi. Survival and proliferative ability of various living cell types after laser-induced forward transfer. *Tissue engineering*, 11:1817–1823, 2005.
- [47] David M. Kingsley, Andrew D. Dias, Cassandra L. Roberge, and David T. Corr. Laser direct-write bioprinting: A powerful tool for engineering cellular microenvironments. In *3D Bioprinting and Nanotechnology in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, pages 123–151. Elsevier, 2022.
- [48] P.K Wu, B.R Ringeisen, J Callahan, M Brooks, D.M Bubb, H.D Wu, A Piqué, B Spargo, R.A McGill, and D.B Chrisey. The deposition, structure, pattern deposition, and activity of biomaterial thin-films by matrix-assisted pulsed-laser evaporation (MAPLE) and MAPLE direct write. *Thin Solid Films*, 398-399:607–614, nov 2001.

- [49] Stefan Jentsch, Ramin Nasehi, Christoph Kuckelkorn, Benedikt Gundert, Sanja Aveic, and Horst Fischer. Multiscale 3d bioprinting by nozzle-free acoustic droplet ejection. *Small Methods*, 5(6):2000971, may 2021.
- [50] Jason A. Barron, David B. Krizman, and Bradley R. Ringeisen. Laser printing of single cells: Statistical analysis, cell viability, and stress. *Annals of Biomedical Engineering*, 33(2):121–130, feb 2005.
- [51] Ibrahim T. Ozbolat and Monika Hospodiuk. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials*, 76:321–343, jan 2016.
- [52] Hossein Ravanbakhsh, Guangyu Bao, Zeyu Luo, Luc G. Mongeau, and Yu Shrike Zhang. Composite inks for extrusion printing of biological and biomedical constructs. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(9):4009–4026, nov 2020.
- [53] Elham Davoodi, Einollah Sarikhani, Hossein Montazerian, Samad Ahadian, Marco Constantini, Wojciech Swieszkowski, Stephanie Michelle Willerth, Konrad Walus, Mohammad Mofidfar, Ehsan Toyserkani, Ali Khademhosseini, and Nureddin Ashammakhi. Extrusion and microfluidic-based bioprinting to fabricate biomimetic tissues and organs. *Advanced Materials Technologies*, 5(8):1901044, may 2020.
- [54] Renjie Liang, Yuqing Gu, Yicong Wu, Varitsara Bunpetch, and Shufang Zhang. Lithography-based 3d bioprinting and bioinks for bone repair and regeneration. *ACS Biomaterials Science; Engineering*, 7(3):806–816, jul 2020.
- [55] Mihyun Lee, Riccardo Rizzo, František Surman, and Marcy Zenobi-Wong. Guiding lights: Tissue bioprinting using photoactivated materials. *Chem. Rev.*, 120(19):10950–11027, October 2020.
- [56] Brett E. Kelly, Indrasen Bhattacharya, Hossein Heidari, Maxim Shusteff, Christopher M. Spadaccini, and Hayden K. Taylor. Volumetric additive manufacturing via tomographic reconstruction. *Science*, 363(6431):1075–1079, mar 2019.
- [57] J Groll, J A Burdick, D-W Cho, B Derby, M Gelinsky, S C Heilshorn, T Jüngst, J Malda, V A Mironov, K Nakayama, A Ovsianikov, W Sun, S Takeuchi, J J Yoo, and T B F Woodfield. A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication*, 11(1):013001, nov 2018.
- [58] Sara Cristina Pedroza-González, Marisela Rodriguez-Salvador, Baruc Emet Pérez-Benítez, Mario Moisés Alvarez, and Grissel Trujillo-de Santiago. Bioinks for 3d bioprinting: A scientometric analysis of two decades of progress. *International journal of bioprinting*, 7:333, 2021.
- [59] Liyan Lu, Shiliang Yuan, Jing Wang, Yun Shen, Shuwen Deng, Luyang Xie, and Qixiang Yang. The formation mechanism of hydrogels. *Current Stem Cell Research; Therapy*, 13(7):490–496, aug 2018.
- [60] Leda Klouda. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97:338–349, nov 2015.
- [61] Lukas Hahn, Emine Karakaya, Theresa Zorn, Benedikt Sochor, Matthias Maier, Philipp Stahlhut, Stefan Forster, Karl Fischer, Sebastian Seiffert, Ann-Christin Pöppler, Rainer Detsch, and Robert Luxenhofer. An inverse thermogelling bioink based on an ABA-type poly(2-oxazoline) amphiphile. *Biomacromolecules*, 22(7):3017–3027, jun 2021.

- [62] Lukas Hahn, Matthias Beudert, Marcus Gutmann, Larissa Keßler, Philipp Stahlhut, Lena Fischer, Emine Karakaya, Thomas Lorson, Ingo Thievensen, Rainer Detsch, Tessa Lühmann, and Robert Luxenhofer. From thermogelling hydrogels toward functional bioinks: Controlled modification and cytocompatible crosslinking. *Macromolecular Bioscience*, 21(10):2100122, jul 2021.
- [63] Sarah Graham, Paula Facal Marina, and Anton Blencowe. Thermoresponsive polysaccharides and their thermoreversible physical hydrogel networks. *Carbohydrate Polymers*, 207:143–159, mar 2019.
- [64] Khoon S. Lim, Jonathan H. Galarraga, Xiaolin Cui, Gabriella C. J. Lindberg, Jason A. Burdick, and Tim B. F. Woodfield. Fundamentals and applications of photo-cross-linking in bioprinting. *Chem. Rev.*, 120(19):10662–10694, October 2020.
- [65] Yongsheng Gao, Kevin Peng, and Samir Mitragotri. Covalently crosslinked hydrogels via step-growth reactions: Crosslinking chemistries, polymers, and clinical impact. *Advanced Materials*, 33(25):2006362, may 2021.
- [66] Eneko Axpe and Michelle L. Oyen. Applications of alginate-based bioinks in 3d bioprinting. *International journal of molecular sciences*, 17, November 2016.
- [67] Byoung Soo Kim, Sanskrita Das, Jinah Jang, and Dong-Woo Cho. Decellularized extracellular matrix-based bioinks for engineering tissue- and organ-specific microenvironments. *Chem. Rev.*, 120(19):10608–10661, October 2020.
- [68] Anastasia Shpichka, Daria Osipova, Yuri Efremov, Polina Bikmulina, Nastasia Kosheleva, Marina Lipina, Evgeny A. Bezrukov, Roman B. Sukhanov, Anna B. Solovieva, Massoud Vosough, and Peter Timashev. Fibrin-based bioinks: New tricks from an old dog. *International journal of bioprinting*, 6:269, 2020.
- [69] A. Leucht, A.-C. Volz, J. Rogal, K. Borchers, and P. J. Kluger. Advanced gelatin-based vascularization bioinks for extrusion-based bioprinting of vascularized bone equivalents. *Scientific Reports*, 10(1), mar 2020.
- [70] D Petta, U D’Amora, L Ambrosio, D W Grijpma, D Eglin, and M D’Este. Hyaluronic acid as a bioink for extrusion-based 3d printing. *Biofabrication*, 12(3):032001, may 2020.
- [71] Egor Olegovich Osidak, Vadim Igorevich Kozhukhov, Mariya Sergeevna Osidak, and Sergey Petrovich Domogatsky. Collagen as bioink for bioprinting: A comprehensive review. *International journal of bioprinting*, 6:270, 2020.
- [72] Xuan Hao Tan, Ling Liu, Alexander Mitryashkin, Yunyun Wang, and James Cho Hong Goh. Silk fibroin as a bioink: A thematic review of functionalization strategies for bioprinting applications. *ACS Biomaterials Science; Engineering*, 8(8):3242–3270, jul 2022.
- [73] Monika Hospodiuk, Madhuri Dey, Donna Sosnoski, and Ibrahim T. Ozbolat. The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. *Biotechnology Advances*, 35(2):217–239, mar 2017.
- [74] P. Selcan Gungor-Ozkerim, Ilyas Inci, Yu Shrike Zhang, Ali Khademhosseini, and Mehmet Remzi Dokmeci. Bioinks for 3d bioprinting: an overview. *Biomaterials Science*, 6(5):915–946, 2018.
- [75] Wen Yang, Lin Wang, Evan M. Mettenbrink, Paul L. DeAngelis, and Stefan Wilhelm. Nanoparticle toxicology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 61(1):269–289, jan 2021.

- [76] Chukwuebuka Egbuna, Vijaykumar K. Parmar, Jaison Jeevanandam, Shahira M. Ezzat, Kingsley C. Patrick-Iwuanyanwu, Charles Oluwaseun Adetunji, Johra Khan, Eugene N. Onyeike, Chukwuemelie Zedech Uche, Muhammad Akram, Mervat S. Ibrahim, Nihal M. El Mahdy, Chinaza Godswill Awuchi, Kaliyaperumal Saravanan, Habibu Tijjani, Uchenna Estella Odoh, Mohammed Messaoudi, Jonathan C. Ifemeje, Michael C. Olisah, Nebuchi Jane Ezeofor, Chukwudi Jude Chikwendu, and Chinwe Gloria Ibeabuchi. Toxicity of nanoparticles in biomedical application: Nanotoxicology. *Journal of Toxicology*, 2021:1–21, jul 2021.
- [77] Khaow Tonsomboon and Michelle L. Oyen. Composite electrospun gelatin fiber-alginate gel scaffolds for mechanically robust tissue engineered cornea. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 21:185–194, may 2013.
- [78] Subhash Waghmare, Sagar Shelare, Kapil Aglawe, and Pravin Khope. A mini review on fibre reinforced polymer composites. *Materials Today: Proceedings*, 54:682–689, 2022.
- [79] Brendan P. Croom, Andrew Abbott, James W. Kemp, Lisa Rueschhoff, Louisa Smieska, Arthur Woll, Stanislav Stoupin, and Hilmar Koerner. Mechanics of nozzle clogging during direct ink writing of fiber-reinforced composites. *Additive Manufacturing*, 37:101701, jan 2021.
- [80] Hao Zhang, Lixing Zhang, Haoqi Zhang, Jiang Wu, Xizhong An, and Dongmin Yang. Fibre bridging and nozzle clogging in 3d printing of discontinuous carbon fibre-reinforced polymer composites: coupled CFD-DEM modelling. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 117(11-12):3549–3562, aug 2021.
- [81] Aldo Leal-Egaña, Gregor Lang, Carolin Mauerer, Jasmin Wickinghoff, Michael Weber, Stefan Geimer, and Thomas Scheibel. Interactions of fibroblasts with different morphologies made of an engineered spider silk protein. *Advanced Engineering Materials*, 14(3):B67–B75, dec 2011.
- [82] James Alexander Reid, Kiera D. Dwyer, Phillip R. Schmitt, Arvin H. Soepriatna, Kareen LK Coulombe, and Anthony Callanan. Architected fibrous scaffolds for engineering anisotropic tissues. *Biofabrication*, 13(4):045007, July 2021.
- [83] Thomas Lee Jenkins and Dianne Little. Synthetic scaffolds for musculoskeletal tissue engineering: cellular responses to fiber parameters. *npj Regenerative Medicine*, 4(1), jun 2019.
- [84] H L Cox. The elasticity and strength of paper and other fibrous materials. *British Journal of Applied Physics*, 3(3):72–79, mar 1952.
- [85] Ei. M. Asloun, M. Nardin, and J. Schultz. Stress transfer in single-fibre composites: effect of adhesion, elastic modulus of fibre and matrix, and polymer chain mobility. *Journal of Materials Science*, 24(5):1835–1844, may 1989.
- [86] Katharina Haag and Jörg Müssig. Scatter in tensile properties of flax fibre bundles: influence of determination and calculation of the cross-sectional area. *Journal of Materials Science*, 51(17):7907–7917, may 2016.
- [87] J. Müssig and N. Graupner. Test Methods for Fibre/Matrix Adhesion in Cellulose Fibre-Reinforced Thermoplastic Composite Materials: A Critical Review. *Reviews of Adhesion and Adhesives*, 8(2):68–129, June 2020.

- [88] Paria Ghaderinejad, Najmeh Najmoddin, Zohreh Bagher, Mahdi Saeed, Sarah Karimi, Sara Simorgh, and Mohamad Pezeshki-Modaress. An injectable anisotropic alginate hydrogel containing oriented fibers for nerve tissue engineering. *Chemical Engineering Journal*, 420:130465, September 2021.
- [89] Ching Hao Lee, Abdan Khalina, and Seng Hua Lee. Importance of Interfacial Adhesion Condition on Characterization of Plant-Fiber-Reinforced Polymer Composites: A Review. *Polymers*, 13(3):438, January 2021.
- [90] Jiawei Yang, Ruobing Bai, Baohong Chen, and Zhigang Suo. Hydrogel Adhesion: A Supramolecular Synergy of Chemistry, Topology, and Mechanics. *Advanced Functional Materials*, 30(2):1901693, 2020.
- [91] Tim Huber and Jörg Müssig. Fibre matrix adhesion of natural fibres cotton, flax and hemp in polymeric matrices analyzed with the single fibre fragmentation test. *Composite Interfaces*, 15(2-3):335–349, January 2008.
- [92] Yihui Pan and Zheng Zhong. A nonlinear constitutive model of unidirectional natural fiber reinforced composites considering moisture absorption. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 69:132–142, sep 2014.
- [93] N. Lopattananon, Y. Payae, and M. Seadan. Influence of fiber modification on interfacial adhesion and mechanical properties of pineapple leaf fiber-epoxy composites. *Journal of Applied Polymer Science*, 110(1):433–443, oct 2008.
- [94] L. Q. N. Tran, X. W. Yuan, D. Bhattacharyya, C. Fuentes, A. W. Van Vuure, and I. Verpoest. Fiber-matrix interfacial adhesion in natural fiber composites. *International Journal of Modern Physics B*, 29(10n11):1540018, April 2015.
- [95] Praveen Thoniyot, Mein Jin Tan, Anis Abdul Karim, David James Young, and Xian Jun Loh. Nanoparticle–Hydrogel Composites: Concept, Design, and Applications of These Promising, Multi-Functional Materials. *Advanced Science*, 2(1-2):1400010, 2015.
- [96] Corinna Dannert, Bjørn Torger Stokke, and Rita S. Dias. Nanoparticle-Hydrogel Composites: From Molecular Interactions to Macroscopic Behavior. *Polymers*, 11(2):275, February 2019.
- [97] Morten Karsdal. *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin*. Elsevier Science and Technology Books, 2016.
- [98] Roumen Pankov and Kenneth M. Yamada. Fibronectin at a glance. *Journal of cell science*, 115:3861–3863, October 2002.
- [99] Peter Fratzl. Cellulose and collagen: from fibres to tissues. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 8(1):32–39, 2003.
- [100] Riccardo Gottardi, Uwe Hansen, Roberto Raiteri, Marko Loparic, Marcel Düggelein, Daniel Mathys, Niklaus F. Friederich, Peter Bruckner, and Martin Stolz. Supramolecular organization of collagen fibrils in healthy and osteoarthritic human knee and hip joint cartilage. *PLOS ONE*, 11(10):e0163552, oct 2016.
- [101] T. Arts, K. D. Costa, J. W. Covell, and A. D. McCulloch. Relating myocardial laminar architecture to shear strain and muscle fiber orientation. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 280:H2222–H2229, May 2001.

- [102] L. Geerts, P. Bovendeerd, K. Nicolay, and T. Arts. Characterization of the normal cardiac myofiber field in goat measured with mr-diffusion tensor imaging. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 283:H139–H145, July 2002.
- [103] P. M. Nielsen, I. J. Le Grice, B. H. Smaill, and P. J. Hunter. Mathematical model of geometry and fibrous structure of the heart. *The American journal of physiology*, 260:H1365–H1378, April 1991.
- [104] Megan O. Chrobak, Katrina J. Hansen, Joshua R. Gershlak, Maria Vratsanos, Marianne Kanellias, Glenn R. Gaudette, and George D. Pins. Design of a fibrin microthread-based composite layer for use in a cardiac patch. *ACS Biomaterials Science ; Engineering*, 3(7):1394–1403, jan 2017.
- [105] Yasmin A. Kadry and David A. Calderwood. Chapter 22: Structural and signaling functions of integrins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1862(5):183206, may 2020.
- [106] Elizabeth M. Morse, Nina N. Brahme, and David A. Calderwood. Integrin cytoplasmic tail interactions. *Biochemistry*, 53:810–820, February 2014.
- [107] Chungho Kim, Feng Ye, and Mark H. Ginsberg. Regulation of integrin activation. *Annual review of cell and developmental biology*, 27:321–345, 2011.
- [108] Dong-Hwee Kim and Denis Wirtz. Focal adhesion size uniquely predicts cell migration. *The FASEB Journal*, 27(4):1351–1361, dec 2012.
- [109] Andreas Greiner, S. Ramakrishna, Joachim H. Wendorff, and Seema Agarwal. *Electrospinning Materials, Processing, and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2012.
- [110] Seema Agarwal, Andreas Greiner, and Joachim H. Wendorff. Electrospinning. In *Electrospinning*, pages 1–21. John Wiley & Sons, Inc (Ed.), December 2014.
- [111] Geoffrey R. Mitchell and Ben-Zhong Tang. *Electrospinning Principles, Practice and Possibilities*. Royal Society of Chemistry, The, 2015.
- [112] Jon Stanger. *Electrospinning*. Smithers Rapra Technology, 2005.
- [113] Darrell H. Reneker, Alexander L. Yarin, Hao Fong, and Sureporn Koombhongse. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *Journal of Applied Physics*, 87(9):4531–4547, May 2000.
- [114] Seeram Ramakrishna, Kazutoshi Fujihara, Wee-eong Teo, Teik-cheng Lim, and Zuwei Ma. *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. World Scientific Publishing Company, 2005.
- [115] Toby D. Brown, Paul D. Dalton, and Dietmar W. Huttmacher. Direct writing by way of melt electrospinning. *Advanced Materials*, 23(47):5651–5657, nov 2011.
- [116] Dietmar W. Huttmacher and Paul D. Dalton. Melt electrospinning. *Chemistry - An Asian Journal*, 6(1):44–56, nov 2010.
- [117] Chris A. Mack. *Principles of optical lithography*. Wiley, 2007.
- [118] Ali Atta Mohamed Ahmed. *Plasma Surface Treatment of Polymeric Materials*. LAP LAMBERT Academic Publishing, August 2020.

- [119] Wo. Ostwald and R. Auerbach. Ueber die viskosität kolloider lösungen im struktur-, laminar- und turbulenzgebiet. *Kolloid-Zeitschrift*, 38(3):261–280, 1926.
- [120] A. Waele. *Viscometry and Plastometry*. Journal of the Oil and Colour Chemists' Association. Oil and Colour Chemists' Association, 1923.
- [121] Malcolm M. Cross. Rheology of non-newtonian fluids: A new flow equation for pseudo-plastic systems. *Journal of Colloid Science*, 20(5):417–437, jun 1965.
- [122] K. Yasuda, R. C. Armstrong, and R. E. Cohen. Shear flow properties of concentrated solutions of linear and star branched polystyrenes. *Rheologica Acta*, 20(2):163–178, 1981.
- [123] Thomas Mezger. *The Rheology Handbook*. Vincentz Network GmbH, August 2020.
- [124] Thomas M. Robinson, Dietmar W. Hutmacher, and Paul D. Dalton. The next frontier in melt electrospinning: Taming the jet. *Advanced Functional Materials*, 29(44):1904664, aug 2019.
- [125] Christoph Böhm, Philipp Stahlhut, Jan Weichhold, Andrei Hrynevich, Jörg Teßmar, and Paul D. Dalton. The multiweek thermal stability of medical-grade poly( $\epsilon$ -caprolactone) during melt electrowriting. *Small*, 18(3):2104193, nov 2021.
- [126] Naomi C. Paxton, Selina W. K. Ho, Bryan T. Tuten, Josh Lipton-Duffin, and Maria A. Woodruff. Degradation of melt electrowritten PCL scaffolds following melt processing and plasma surface treatment. *Macromolecular Rapid Communications*, 42(23):2100433, oct 2021.
- [127] Jos Malda, Jetze Visser, Ferry P. Melchels, Tomasz Jüngst, Wim E. Hennink, Wouter J. A. Dhert, Jürgen Groll, and Dietmar W. Hutmacher. 25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication. *Advanced Materials*, 25(36):5011–5028, aug 2013.
- [128] Tomasz Jungst, Willi Smolan, Kristin Schacht, Thomas Scheibel, and Jürgen Groll. Strategies and molecular design criteria for 3d printable hydrogels. *Chemical Reviews*, 116(3):1496–1539, oct 2015.
- [129] Vanessa Tanja Trossmann and Thomas Scheibel. Design of recombinant spider silk proteins for cell type specific binding. *Advanced Healthcare Materials*, page 2202660, jan 2023.
- [130] B. Vincent Crist. *Handbook of Monochromatic XPS Spectra, Semiconductors*. Wiley, 2000.
- [131] E.M. Abdelrazek, A.M. Hezma, A. El-khodary, and A.M. Elzayat. Spectroscopic studies and thermal properties of PCL/PMMA biopolymer blend. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(1):10–15, mar 2016.
- [132] Tehseen Riaz, Rabia Zeeshan, Faiza Zarif, Kanwal Ilyas, Nawshad Muhammad, Sher Zaman Safi, Abdur Rahim, Syed A. A. Rizvi, and Ihtesham Ur Rehman. FTIR analysis of natural and synthetic collagen. *Applied Spectroscopy Reviews*, 53(9):703–746, mar 2018.
- [133] David F. Holmes, Yinhui Lu, Tobias Starborg, and Karl E. Kadler. Collagen fibril assembly and function. In *Current Topics in Developmental Biology*, pages 107–142. Elsevier, 2018.
- [134] A. Cipitria, A. Skelton, T. R. Dargaville, P. D. Dalton, and D. W. Hutmacher. Design, fabrication and characterization of pcl electrospun scaffolds—a review. *J. Mater. Chem.*, 21:9419–9453, 2011.

- [135] Maria Ann Woodruff and Dietmar Werner Hutmacher. The return of a forgotten polymer—polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, 35(10):1217–1256, oct 2010.
- [136] Nadeem Siddiqui, Braja Kishori, Saranya Rao, Mohammad Anjum, Venkata Hemanth, Swati Das, and Esmail Jabbari. Electropsun polycaprolactone fibres in bone tissue engineering: A review. *Molecular Biotechnology*, 63(5):363–388, mar 2021.
- [137] Xin Jing, Hao-Yang Mi, Xin-Chao Wang, Xiang-Fang Peng, and Lih-Sheng Turng. Shish-kebab-structured poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibers hierarchically decorated with chitosan–poly( $\epsilon$ -caprolactone) copolymers for bone tissue engineering. *ACS Applied Materials; Interfaces*, 7(12):6955–6965, mar 2015.
- [138] Marina P. Arrieta, Adrián Leonés Gil, Maysa Yusef, José M. Kenny, and Laura Peponi. Electrospinning of PCL-based blends: Processing optimization for their scalable production. *Materials*, 13(17):3853, sep 2020.
- [139] R.A. O’Connor, P.A. Cahill, and G.B. McGuinness. Effect of electrospinning parameters on the mechanical and morphological characteristics of small diameter PCL tissue engineered blood vessel scaffolds having distinct micro and nano fibre populations – a DOE approach. *Polymer Testing*, 96:107119, apr 2021.
- [140] Lucy A. Bosworth and Sandra Downes. Acetone, a sustainable solvent for electrospinning poly( $\epsilon$ -caprolactone) fibres: Effect of varying parameters and solution concentrations on fibre diameter. *Journal of Polymers and the Environment*, 20(3):879–886, apr 2012.
- [141] P. Ginestra, E. Ceretti, and A. Fiorentino. Electrospinning of poly-caprolactone for scaffold manufacturing: Experimental investigation on the process parameters influence. *Procedia CIRP*, 49:8–13, 2016.
- [142] Riaz T, Delaite C, Khenoussi N, Adolphe D, and Schacher L. A study of electrospinning and characterization of poly (epsilon-caprolactone) nanofibers. *Journal of Fashion Technology and Textile Engineering*, s5, 2018.
- [143] C. J. Luo, E. Stride, and M. Edirisinghe. Mapping the influence of solubility and dielectric constant on electrospinning polycaprolactone solutions. *Macromolecules*, 45(11):4669–4680, may 2012.
- [144] Roya M. Nezarati, Michelle B. Eifert, and Elizabeth Cosgriff-Hernandez. Effects of humidity and solution viscosity on electrospun fiber morphology. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 19(10):810–819, oct 2013.
- [145] Soghra Ramazani and Mohammad Karimi. Investigating the influence of temperature on electrospinning of polycaprolactone solutions. *e-Polymers*, 14(5):323–333, sep 2014.
- [146] Ipek Y Enis, Jakub Vojtech, and Telem G Sadikoglu. Alternative solvent systems for polycaprolactone nanowebs via electrospinning. *Journal of Industrial Textiles*, 47(1):57–70, July 2017.
- [147] Andrew Peacock. *Polymer chemistry : properties and applications*. Hanser Gardner Publications, Munich Cincinnati, Ohio, 2006.
- [148] S.G. Weissberg, R. Simha, and S. Rothman. Viscosity of dilute and moderately concentrated polymer solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 47(4):298, oct 1951.

- [149] Shigeharu Onogi, Toshiro Masuda, Nobuyuki Miyana, and Yasuo Kimura. Dependence of viscosity of concentrated polymer solutions upon molecular weight and concentration. *Journal of Polymer Science Part A-2: Polymer Physics*, 5(5):899–913, sep 1967.
- [150] Takuro Hayahara and Seiji Takao. Relationship between polymer concentration and molecular weight in the viscosity behavior of concentrated solution. *Kolloid-Zeitschrift; Zeitschrift für Polymere*, 225(2):106–111, aug 1968.
- [151] Iwao Teraoka. *Polymer Solutions*. John Wiley & Sons, Inc., feb 2002.
- [152] F. Bueche. Melt viscosity of polymers: Effect of polydispersity. *Journal of Polymer Science*, 43(142):527–530, apr 1960.
- [153] Renee J. Sifri, Omar Padilla-Vélez, Geoffrey W. Coates, and Brett P. Fors. Controlling the Shape of Molecular Weight Distributions in Coordination Polymerization and Its Impact on Physical Properties. *Journal of the American Chemical Society*, 142(3):1443–1448, January 2020.
- [154] Xiangnan Ye and Tam Sridhar. Effects of the Polydispersity on Rheological Properties of Entangled Polystyrene Solutions. *Macromolecules*, 38(8):3442–3449, April 2005.
- [155] Ronald W. Nunes, John R. Martin, and Julian F. Johnson. Influence of molecular weight and molecular weight distribution on mechanical properties of polymers. *Polymer Engineering & Science*, 22(4):205–228, 1982.
- [156] Suresh L. Shenoy, W. Douglas Bates, Harry L. Frisch, and Gary E. Wnek. Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: good solvent, non-specific polymer–polymer interaction limit. *Polymer*, 46(10):3372–3384, April 2005.
- [157] Ljiljana Palangetic, Naveen Krishna Reddy, Siddarth Srinivasan, Robert E. Cohen, Gareth H. McKinley, and Christian Clasen. Dispersity and spinnability: Why highly polydisperse polymer solutions are desirable for electrospinning. *Polymer*, 55(19):4920–4931, September 2014.
- [158] Lord Rayleigh. On the instability of jets. *Proceedings of The London Mathematical Society*, 1:4–13, 1878.
- [159] J. C. L. E. R. K. MAXWELL. Statique expérimentale et théorique des liquides soumis aux seules forces moléculaires. *Nature*, 10(242):119–121, 1874.
- [160] Constantin Maximilian Weber. Zum zerfall eines flüssigkeitsstrahles. *Zamm-zeitschrift Für Angewandte Mathematik Und Mechanik*, 11:136–154, 1931.
- [161] H. J. Kull. Theory of the Rayleigh-Taylor instability. *Physics Reports*, 206(5):197–325, August 1991.
- [162] Jeong-yong Park, Kahp Y. Suh, Soon-min Seo, and Hong H. Lee. Anisotropic rupture of polymer strips driven by Rayleigh instability. *The Journal of Chemical Physics*, 124(21):214710, June 2006.
- [163] Ping-Wen Fan, Wan-Ling Chen, Ting-Hsien Lee, Yu-Jing Chiu, and Jiun-Tai Chen. Rayleigh-Instability-Driven Morphology Transformation by Thermally Annealing Electrospun Polymer Fibers on Substrates. *Macromolecules*, 45(14):5816–5822, July 2012.

- [164] Xiang-Fa Wu, Yury Salkovskiy, and Yuris A. Dzenis. Modeling of solvent evaporation from polymer jets in electrospinning. *Applied Physics Letters*, 98(22):223108, may 2011.
- [165] O. Wilhelm, L. Mädler, and S.E. Pratsinis. Electropray evaporation and deposition. *Journal of Aerosol Science*, 34(7):815–836, jul 2003.
- [166] Shengchang Zhang, Christine Campagne, and Fabien Salaün. Influence of solvent selection in the electrospaying process of polycaprolactone. *Applied Sciences*, 9(3):402, jan 2019.
- [167] Alan Í. S. Morais, Ewerton G. Vieira, Samson Afewerki, Ricardo B. Sousa, Luzia M. C. Honorio, Anallyne N. C. O. Cambrussi, Jailson A. Santos, Roosevelt D. S. Bezerra, Josy A. O. Furtini, Edson C. Silva-Filho, Thomas J. Webster, and Anderson O. Lobo. Fabrication of polymeric microparticles by electropray: The impact of experimental parameters. *Journal of Functional Biomaterials*, 11(1):4, jan 2020.
- [168] Dirk W. Schubert. Revealing novel power laws and quantization in electrospinning considering jet splitting—toward predicting fiber diameter and its distribution. *Macromol. Theory Simul.*, 28(4):1900006, July 2019.
- [169] Guillaume Toussaint, Hugues Bodiguel, Frédéric Doumenc, Béatrice Guerrier, and Catherine Allain. Experimental characterization of buoyancy- and surface tension-driven convection during the drying of a polymer solution. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 51(17):4228–4237, August 2008.
- [170] N. Bassou and Y. Rharbi. Role of Bénard-Marangoni Instabilities during Solvent Evaporation in Polymer Surface Corrugations. *Langmuir*, 25(1):624–632, January 2009.
- [171] Dharmansh Deshawar, Karan Gupta, and Paresh Chokshi. Electrospinning of polymer solutions: An analysis of instability in a thinning jet with solvent evaporation. *Polymer*, 202:122656, August 2020.
- [172] C. J. Luo and M. Edirisinghe. Core-Liquid-Induced Transition from Coaxial Electropray to Electrospinning of Low-Viscosity Poly(lactide-co-glycolide) Sheath Solution. *Macromolecules*, 47(22):7930–7938, November 2014.
- [173] Christopher J. Ellison, Alhad Phatak, David W. Giles, Christopher W. Macosko, and Frank S. Bates. Melt blown nanofibers: Fiber diameter distributions and onset of fiber breakup. *Polymer*, 48(11):3306–3316, May 2007.
- [174] Hannah Haag, David Sonnleitner, Gregor Lang, and Paul D. Dalton. Melt electrowriting to produce microfiber fragments. *Polymers for Advanced Technologies*, 33(6):1989–1992, feb 2022.
- [175] Toby D. Brown, Fredrik Edin, Nicola Detta, Anthony D. Skelton, Dietmar W. Hutmacher, and Paul D. Dalton. Melt electrospinning of poly(e-caprolactone) scaffolds: Phenomenological observations associated with collection and direct writing. *Materials Science and Engineering: C*, 45:698–708, dec 2014.
- [176] Paul D. Dalton. Melt electrowriting with additive manufacturing principles. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 2:49–57, jun 2017.
- [177] Gernot Hochleitner, Fei Chen, Carina Blum, Paul D. Dalton, Brian Amsden, and Jürgen Groll. Melt electrowriting below the critical translation speed to fabricate crimped elastomer scaffolds with non-linear extension behaviour mimicking that of ligaments and tendons. *Acta Biomaterialia*, 72:110–120, may 2018.

- [178] Ievgenii Liashenko, Andrei Hrynevich, and Paul D. Dalton. Designing outside the box: Unlocking the geometric freedom of melt electrowriting using microscale layer shifting. *Advanced Materials*, 32(28):2001874, may 2020.
- [179] Naomi Paxton, Willi Smolan, Thomas Böck, Ferry Melchels, Jürgen Groll, and Tomasz Jungst. Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. *Biofabrication*, 9(4):044107, nov 2017.
- [180] Teng Gao, Gregory J Gillispie, Joshua S Copus, Anil Kumar PR, Young-Joon Seol, Anthony Atala, James J Yoo, and Sang Jin Lee. Optimization of gelatin–alginate composite bioink printability using rheological parameters: a systematic approach. *Biofabrication*, 10(3):034106, jun 2018.
- [181] Silke Wüst, Marie E. Godla, Ralph Müller, and Sandra Hofmann. Tunable hydrogel composite with two-step processing in combination with innovative hardware upgrade for cell-based three-dimensional bioprinting. *Acta Biomaterialia*, 10(2):630–640, feb 2014.
- [182] A Ribeiro, M M Blokzijl, R Levato, C W Visser, M Castilho, W E Hennink, T Vermonden, and J Malda. Assessing bioink shape fidelity to aid material development in 3d bioprinting. *Biofabrication*, 10(1):014102, nov 2017.
- [183] Chen Hu, Lukas Hahn, Mengshi Yang, Alexander Altmann, Philipp Stahlhut, Jürgen Groll, and Robert Luxenhofer. Improving printability of a thermoresponsive hydrogel biomaterial ink by nanoclay addition. *Journal of Materials Science*, 56(1):691–705, sep 2020.
- [184] Daniel Therriault, Scott R. White, and Jennifer A. Lewis. Rheological behavior of fugitive organic inks for direct-write assembly. *Applied Rheology*, 17(1):10112–1–10112–8, feb 2007.
- [185] Liliang Ouyang, Rui Yao, Yu Zhao, and Wei Sun. Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3d bioplotting of embryonic stem cells. *Biofabrication*, 8(3):035020, sep 2016.
- [186] Ahasan Habib, Venkatachalem Sathish, Sanku Mallik, and Bashir Khoda. 3d printability of alginate-carboxymethyl cellulose hydrogel. *Materials*, 11(3):454, mar 2018.
- [187] L A Hockaday, K H Kang, N W Colangelo, P Y C Cheung, B Duan, E Malone, J Wu, L N Girardi, L J Bonassar, H Lipson, C C Chu, and J T Butcher. Rapid 3d printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds. *Biofabrication*, 4(3):035005, aug 2012.
- [188] Khoon S. Lim, Benjamin S. Schon, Naveen V. Mekhileri, Gabriella C. J. Brown, Catherine M. Chia, Sujay Prabakar, Gary J. Hooper, and Tim B. F. Woodfield. New visible-light photoinitiating system for improved print fidelity in gelatin-based bioinks. *ACS Biomaterials Science; Engineering*, 2(10):1752–1762, aug 2016.
- [189] Johnson H. Y. Chung, Sina Naficy, Zhilian Yue, Robert Kapsa, Anita Quigley, Simon E. Moulton, and Gordon G. Wallace. Bio-ink properties and printability for extrusion printing living cells. *Biomaterials Science*, 1(7):763, 2013.
- [190] Jonas Hazur, Rainer Detsch, Emine Karakaya, Joachim Kaschta, Jörg Teßmar, Dominik Schneiderei, Oliver Friedrich, Dirk W Schubert, and Aldo R Boccaccini. Improving alginate printability for biofabrication: establishment of a universal and homogeneous pre-crosslinking technique. *Biofabrication*, 12(4):045004, jul 2020.

- [191] Sean V. Murphy, Aleksander Skardal, and Anthony Atala. Evaluation of hydrogels for bioprinting applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101A(1):272–284, aug 2012.
- [192] Jia Jia, Dylan J. Richards, Samuel Pollard, Yu Tan, Joshua Rodriguez, Richard P. Visconti, Thomas C. Trusk, Michael J. Yost, Hai Yao, Roger R. Markwald, and Ying Mei. Engineering alginate as bioink for bioprinting. *Acta Biomaterialia*, 10(10):4323–4331, oct 2014.
- [193] B. Duan, E. Kapetanovic, L.A. Hockaday, and J.T. Butcher. Three-dimensional printed trileaflet valve conduits using biological hydrogels and human valve interstitial cells. *Acta Biomaterialia*, 10(5):1836–1846, may 2014.
- [194] Yong He, FeiFei Yang, HaiMing Zhao, Qing Gao, Bing Xia, and JianZhong Fu. Research on the printability of hydrogels in 3d bioprinting. *Scientific Reports*, 6(1), jul 2016.
- [195] Kajsa Markstedt, Athanasios Mantas, Ivan Tournier, Héctor Martínez Ávila, Daniel Hägg, and Paul Gatenholm. 3d bioprinting human chondrocytes with nanocellulose–alginate bioink for cartilage tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, 16(5):1489–1496, apr 2015.
- [196] Dalila Petta, Dirk W. Grijpma, Mauro Alini, David Eglin, and Matteo D’Este. Three-dimensional printing of a tyramine hyaluronan derivative with double gelation mechanism for independent tuning of shear thinning and postprinting curing. *ACS Biomaterials Science; Engineering*, 4(8):3088–3098, jul 2018.
- [197] Johan Göhl, Kajsa Markstedt, Andreas Mark, Karl Håkansson, Paul Gatenholm, and Fredrik Edelvik. Simulations of 3d bioprinting: predicting bioprintability of nanofibrillar inks. *Biofabrication*, 10(3):034105, jun 2018.
- [198] Gregory Gillispie, Peter Prim, Joshua Copus, John Fisher, Antonios G Mikos, James J Yoo, Anthony Atala, and Sang Jin Lee. Assessment methodologies for extrusion-based bioink printability. *Biofabrication*, 12(2):022003, feb 2020.
- [199] N Pandit. Loss of gelation ability of pluronic® f127 in the presence of some salts. *International Journal of Pharmaceutics*, 145(1-2):129–136, dec 1996.
- [200] Julian C. Gilbert, Julie L. Richardson, Martyn C. Davies, Karen J. Palin, and Jonathan Hadgraft. The effect of solutes and polymers on the gelation properties of pluronic f-127 solutions for controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 5(2):113–118, sep 1987.
- [201] Natalie Gjerde, Kaizheng Zhu, Bo Nyström, and Kenneth D. Knudsen. Effect of pcl end-groups on the self-assembly process of pluronic in aqueous media. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 20(4):2585–2596, 2018.
- [202] Yu Zhao, Yang Li, Shuangshuang Mao, Wei Sun, and Rui Yao. The influence of printing parameters on cell survival rate and printability in microextrusion-based 3d cell printing technology. *Biofabrication*, 7(4):045002, nov 2015.
- [203] Andreas Blaeser, Daniela Filipa Duarte Campos, Uta Puster, Walter Richtering, Molly M. Stevens, and Horst Fischer. Controlling shear stress in 3d bioprinting is a key factor to balance printing resolution and stem cell integrity. *Advanced Healthcare Materials*, 5(3):326–333, dec 2015.

- [204] Atabak Ghanizadeh Tabriz, Miguel A Hermida, Nicholas R Leslie, and Wenmiao Shu. Three-dimensional bioprinting of complex cell laden alginate hydrogel structures. *Biofabrication*, 7(4):045012, dec 2015.
- [205] Huijun Li, Sijun Liu, and Li Lin. Rheological study on 3d printability of alginate hydrogel and effect of graphene oxide. *International Journal of Bioprinting*, 2(2), jun 2016.
- [206] Liliang Ouyang, Christopher B. Highley, Christopher B. Rodell, Wei Sun, and Jason A. Burdick. 3d printing of shear-thinning hyaluronic acid hydrogels with secondary cross-linking. *ACS Biomaterials Science; Engineering*, 2(10):1743–1751, jun 2016.
- [207] Malik Salman Haider, Taufiq Ahmad, Mengshi Yang, Chen Hu, Lukas Hahn, Philipp Stahlhut, Jürgen Groll, and Robert Luxenhofer. Tuning the thermogelation and rheology of poly(2-oxazoline)/poly(2-oxazine)s based thermosensitive hydrogels for 3d bioprinting. *Gels*, 7(3):78, jun 2021.
- [208] Annika Lechner, Vanessa T. Trossmann, and Thomas Scheibel. Impact of cell loading of recombinant spider silk based bioinks on gelation and printability. *Macromolecular Bioscience*, 22(3):2100390, dec 2021.
- [209] Cartwright Nelson, Slesha Tuladhar, Loren Launen, and Ahasan Habib. 3d bioprintability of hybrid pre-crosslinked hydrogels. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24):13481, dec 2021.
- [210] Zhouquan Fu, Vincent Angeline, and Wei Sun. Evaluation of printing parameters on 3d extrusion printing of pluronic hydrogels and machine learning guided parameter recommendation. *International Journal of Bioprinting*, 7(4):343, oct 2021.
- [211] S. Schrüfer, D. Sonnleitner, G. Lang, and D. W. Schubert. A novel simple approach to material parameters from commonly accessible rheometer data. *Polymers*, 12(6):1276, jun 2020.
- [212] Dirk W. Schubert. Simple model for the spreading of inks in bioprinting—revealing relevant scaling laws—part i theory. *Macromolecular Theory and Simulations*, 31(1):2100032, sep 2021.
- [213] Sandra E. Noriega, Gulnara I. Hasanova, Min Jeong Schneider, Gustavo F. Larsen, and Anuradha Subramanian. Effect of fiber diameter on the spreading, proliferation and differentiation of chondrocytes on electrospun chitosan matrices. *Cells, tissues, organs*, 195:207–221, 2012.
- [214] Chris A. Bashur, Robyn D. Shaffer, Linda A. Dahlgren, Scott A. Guelcher, and Aaron S. Goldstein. Effect of fiber diameter and alignment of electrospun polyurethane meshes on mesenchymal progenitor cells. *Tissue engineering. Part A*, 15:2435–2445, September 2009.
- [215] Gregory T. Christopherson, Hongjun Song, and Hai-Quan Mao. The influence of fiber diameter of electrospun substrates on neural stem cell differentiation and proliferation. *Biomaterials*, 30:556–564, February 2009.
- [216] Giulio Abagnale, Michael Steger, Vu Hoa Nguyen, Nils Hersch, Antonio Sechi, Sylvia Joussem, Bernd Denecke, Rudolf Merkel, Bernd Hoffmann, Alice Dreser, Uwe Schnakenberg, Arnold Gillner, and Wolfgang Wagner. Surface topography enhances differentiation of mesenchymal stem cells towards osteogenic and adipogenic lineages. *Biomaterials*, 61:316–326, August 2015.

- [217] Omar F. Zouani, Christel Chanseau, Brigitte Brouillaud, Reine Bareille, Florent Deliane, Marie-Pierre Foulc, Ahmad Mehdi, and Marie-Christine Durrieu. Altered nanofeature size dictates stem cell differentiation. *Journal of cell science*, 125:1217–1224, March 2012.
- [218] Jonas C. Rose, David B. Gehlen, Abdolrahman Omidinia-Anarkoli, Maaïke Fölster, Tamás Haraszti, Esther E. Jaekel, and Laura De Laporte. How much physical guidance is needed to orient growing axons in 3d hydrogels? *Advanced Healthcare Materials*, 9(21):2000886, oct 2020.
- [219] Andrew English, Ayesha Azeem, Kyriakos Spanoudes, Eleanor Jones, Bhawana Tripathi, Nandita Basu, Karrina McNamara, Syed A. M. Tofail, Niall Rooney, Graham Riley, Alan O’Riordan, Graham Cross, Dietmar Hutmacher, Manus Biggs, Abhay Pandit, and Dimitrios I. Zeugolis. Substrate topography: A valuable in vitro tool, but a clinical red herring for in vivo tenogenesis. *Acta biomaterialia*, 27:3–12, November 2015.
- [220] Vasudha Chaurey, Frank Block, Yi-Hsuan Su, Po-Chieh Chiang, Edward Botchwey, Chia-Fu Chou, and Nathan S. Swami. Nanofiber size-dependent sensitivity of fibroblast directionality to the methodology for scaffold alignment. *Acta biomaterialia*, 8:3982–3990, November 2012.
- [221] EvelynK.F. Yim, Deepak Jain, Sabrina Mattiassi, and EyleenL Goh. Extracellular matrix and biomimetic engineering microenvironment for neuronal differentiation. *Neural Regeneration Research*, 15(4):573, 2020.
- [222] Henry C. Hsia, Mohan R. Nair, R. Candida Mintz, and Siobhan A. Corbett. The fiber diameter of synthetic bioresorbable extracellular matrix influences human fibroblast morphology and fibronectin matrix assembly. *Plastic and reconstructive surgery*, 127:2312–2320, June 2011.
- [223] Nancy M. Lee, Cevat Eriskan, Thomas Iskratsch, Michael Sheetz, William N. Levine, and Helen H. Lu. Polymer fiber-based models of connective tissue repair and healing. *Biomaterials*, 112:303–312, January 2017.
- [224] Lu Ge, Liangliang Yang, Reinier Bron, Janette K. Burgess, and Patrick van Rijn. Topography-mediated fibroblast cell migration is influenced by direction, wavelength, and amplitude. *ACS Applied Bio Materials*, 3(4):2104–2116, mar 2020.
- [225] Carmen Binder, Vincent Milleret, Heike Hall, Daniel Eberli, and Tessa Lühmann. Influence of micro and submicro poly(lactic-glycolic acid) fibers on sensory neural cell locomotion and neurite growth. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 101:1200–1208, October 2013.
- [226] Han Bing Wang, Michael E. Mullins, Jared M. Cregg, Connor W. McCarthy, and Ryan J. Gilbert. Varying the diameter of aligned electrospun fibers alters neurite outgrowth and schwann cell migration. *Acta biomaterialia*, 6:2970–2978, August 2010.
- [227] Manoochehr Rasekh, Zeeshan Ahmad, Constantinos C. Frangos, Laurent Bozec, Mohan Edirisinghe, and Richard M. Day. Spatial and temporal evaluation of cell attachment to printed polycaprolactone microfibrils. *Acta Biomaterialia*, 9(2):5052–5062, feb 2013.
- [228] Ross Burdis and Daniel J. Kelly. Biofabrication and bioprinting using cellular aggregates, microtissues and organoids for the engineering of musculoskeletal tissues. *Acta Biomaterialia*, 126:1–14, may 2021.

- [229] Shuhui Yang, Jinjin Zhu, Changfeng Lu, Yi Chai, Zheng Cao, Jiaju Lu, Zhe Zhang, He Zhao, Yin-Yuan Huang, Shenglian Yao, Xiangdong Kong, Peixun Zhang, and Xiumei Wang. Aligned fibrin/functionalized self-assembling peptide interpenetrating nanofiber hydrogel presenting multi-cues promotes peripheral nerve functional recovery. *Bioactive Materials*, 8:529–544, feb 2022.
- [230] Dongfang Wang, Xueke Yu, Yiyang Xu, Xiaofeng Wang, Haonan Wang, Yang Zhang, Qian Li, and Lih-Sheng Turng. Physical shish-kebab modification vs. chemical surface coating on expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts for enhanced endothelial cell adhesion. *Materials; Design*, 220:110889, aug 2022.
- [231] Abdolrahman Omidinia-Anarkoli, Rahul Rimal, Yashoda Chandorkar, David B. Gehlen, Jonas C. Rose, Khosrow Rahimi, Tamás Haraszti, and Laura De Laporte. Solvent-induced nanotopographies of single microfibers regulate cell mechanotransduction. *ACS Applied Materials; Interfaces*, 11(8):7671–7685, jan 2019.
- [232] Abdolrahman Omidinia-Anarkoli, John Wesley Ephraim, Rahul Rimal, and Laura De Laporte. Hierarchical fibrous guiding cues at different scales influence linear neurite extension. *Acta Biomaterialia*, 113:350–359, sep 2020.
- [233] Alexandre R. Gingras and Mark H. Ginsberg. Signal Transduction: Physical Deformation of the Membrane Activates Integrins. *Current Biology*, 30(9):R397–R400, May 2020.
- [234] Zhengdong Li, Weiwei Wang, Xun Xu, Karl Kratz, Jie Zou, Liudmila Lysyakova, Matthias Heuchel, Andreas Kurtz, Manfred Gossen, Nan Ma, and Andreas Lendlein. Integrin  $\beta 1$  activation by micro-scale curvature promotes pro-angiogenic secretion of human mesenchymal stem cells. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(35):7415–7425, September 2017.
- [235] Tadahiro Yamashita, Philip Kollmannsberger, Kazuma Mawatari, Takehiko Kitamori, and Viola Vogel. Cell sheet mechanics: How geometrical constraints induce the detachment of cell sheets from concave surfaces. *Acta Biomaterialia*, 45:85–97, November 2016.
- [236] Min-Cheol Kim, Choong Kim, Levi Wood, Devin Neal, Roger D. Kamm, and H. Harry Asada. Integrating focal adhesion dynamics, cytoskeleton remodeling, and actin motor activity for predicting cell migration on 3d curved surfaces of the extracellular matrix. *Integrative Biology*, 4(11):1386, 2012.
- [237] Matthew R. Angle, Andrew Wang, Aman Thomas, Andreas T. Schaefer, and Nicholas A. Melosh. Penetration of cell membranes and synthetic lipid bilayers by nanoprobes. *Biophysical Journal*, 107(9):2091–2100, nov 2014.
- [238] Phammela N. Abarzúa-Illanes, Cristina Padilla, Andrea Ramos, Mauricio Isaacs, Jorge Ramos-Grez, Hugo C. Olguín, and Loreto M. Valenzuela. Improving myoblast differentiation on electrospun poly(epsilon-caprolactone) scaffolds. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 105:2241–2251, August 2017.
- [239] Ajay Tijore, Pingqiang Cai, Mui Hoon Nai, Li Zhuyun, Wang Yu, Chor Yong Tay, Chwee Teck Lim, Xiaodong Chen, and Lay Poh Tan. Role of cytoskeletal tension in the induction of cardiomyogenic differentiation in micropatterned human mesenchymal stem cell. *Advanced healthcare materials*, 4:1399–1407, June 2015.
- [240] Chang Hun Lee, Ho Joon Shin, In Hee Cho, Young-Mi Kang, In Ae Kim, Ki-Dong Park, and Jung-Woog Shin. Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ecm production of human acl fibroblast. *Biomaterials*, 26:1261–1270, April 2005.

- [241] Daniel E. Heath, John J. Lannutti, and Stuart L. Cooper. Electrospun scaffold topography affects endothelial cell proliferation, metabolic activity, and morphology. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 94:1195–1204, September 2010.
- [242] Can Zhang, Huihua Yuan, Huanhuan Liu, Xiao Chen, Ping Lu, Ting Zhu, Long Yang, Zi Yin, Boon Chin Heng, Yanzhong Zhang, and Hongwei Ouyang. Well-aligned chitosan-based ultrafine fibers committed teno-lineage differentiation of human induced pluripotent stem cells for achilles tendon regeneration. *Biomaterials*, 53:716–730, jun 2015.
- [243] Bryce M. Whited and Marissa Nichole Rylander. The influence of electrospun scaffold topography on endothelial cell morphology, alignment, and adhesion in response to fluid flow. *Biotechnology and bioengineering*, 111:184–195, January 2014.
- [244] Xuyan Li, Xiaofeng Wang, Dongshuang Yao, Jing Jiang, Xin Guo, Yanhong Gao, Qian Li, and Changyu Shen. Effects of aligned and random fibers with different diameter on cell behaviors. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 171:461–467, November 2018.
- [245] Harini G. Sundararaghavan, Randi L. Saunders, Daniel A. Hammer, and Jason A. Burdick. Fiber alignment directs cell motility over chemotactic gradients. *Biotechnology and bioengineering*, 110:1249–1254, April 2013.
- [246] Ji-hye Lee, Young Jun Lee, Hyeong-jin Cho, and Heungsoo Shin. Guidance of in vitro migration of human mesenchymal stem cells and in vivo guided bone regeneration using aligned electrospun fibers. *Tissue engineering. Part A*, 20:2031–2042, August 2014.
- [247] Hao-Yang Mi, Max R. Salick, Xin Jing, Wendy C. Crone, Xiang-Fang Peng, and Lih-Sheng Turng. Electrospinning of unidirectionally and orthogonally aligned thermoplastic polyurethane nanofibers: fiber orientation and cell migration. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 103:593–603, February 2015.
- [248] Forrest M. Kievit, Ashleigh Cooper, Soumen Jana, Matthew C. Leung, Kui Wang, Dennis Edmondson, David Wood, Jerry S. H. Lee, Richard G. Ellenbogen, and Miqin Zhang. Aligned chitosan-polycaprolactone polyblend nanofibers promote the migration of glioblastoma cells. *Advanced healthcare materials*, 2:1651–1659, December 2013.
- [249] Jing Wang, Andy Quach, Megan E. Brasch, Christopher E. Turner, and James H. Henderson. On-command on/off switching of progenitor cell and cancer cell polarized motility and aligned morphology via a cytocompatible shape memory polymer scaffold. *Biomaterials*, 140:150–161, September 2017.
- [250] Stephanie I. Fraley, Pei-Hsun Wu, Lijuan He, Yunfeng Feng, Ranjini Krisnamurthy, Gregory D. Longmore, and Denis Wirtz. Three-dimensional matrix fiber alignment modulates cell migration and mt1-mmp utility by spatially and temporally directing protrusions. *Scientific reports*, 5:14580, October 2015.
- [251] Sisi Qin, Vincent Ricotta, Marcia Simon, Richard A. F. Clark, and Miriam H. Rafailovich. Continual cell deformation induced via attachment to oriented fibers enhances fibroblast cell migration. *PloS one*, 10:e0119094, 2015.
- [252] Sitara Vedaraman, Amaury Perez-Tirado, Tamas Haraszti, Jose Gerardo-Nava, Akihiro Nishiguchi, and Laura De Laporte. Anisometric microstructures to determine minimal critical physical cues required for neurite alignment. *Advanced Healthcare Materials*, 10(20):2100874, jul 2021.

- [253] Richard O. Hynes. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110:673–687, September 2002.
- [254] Jenny Z. Kechagia, Johanna Ivaska, and Pere Roca-Cusachs. Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20:457–473, August 2019.
- [255] Jonathan D. Humphries, Adam Byron, and Martin J. Humphries. Integrin ligands at a glance. *Journal of cell science*, 119:3901–3903, October 2006.
- [256] Yingnan Wu, Zheng Yang, Jaslyn Bee Khuan Law, Ai Yu He, Azlina A. Abbas, Vinita Denslin, Tunku Kamarul, James H. P. Hui, and Eng Hin Lee. The combined effect of substrate stiffness and surface topography on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Tissue engineering. Part A*, 23:43–54, January 2017.
- [257] Patrick S. Thayer, Scott S. Verbridge, Linda A. Dahlgren, Sanjeev Kakar, Scott A. Guelcher, and Aaron S. Goldstein. Fiber/collagen composites for ligament tissue engineering: influence of elastic moduli of sparse aligned fibers on mesenchymal stem cells. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 104:1894–1901, August 2016.
- [258] Chunlei Zhu, Suphanee Pongkitwitoon, Jichuan Qiu, Stavros Thomopoulos, and Younan Xia. Design and fabrication of a hierarchically structured scaffold for tendon-to-bone repair. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 30:e1707306, April 2018.
- [259] Susan Babu, I Chen, Sitara Vedaraman, José Gerardo-Nava, Christopher Licht, Yonca Kittel, Tamás Haraszti, Jacopo Di Russo, and Laura De Laporte. How do the local physical, biochemical, and mechanical properties of an injectable synthetic anisotropic hydrogel affect oriented nerve growth? *Advanced Functional Materials*, 32(50):2202468, aug 2022.
- [260] Ting-Ting Yu, Fu-Zhai Cui, Qing-Yuan Meng, Juan Wang, De-Cheng Wu, Jin Zhang, Xiao-Xing Kou, Rui-Li Yang, Yan Liu, Yu Shrike Zhang, Fei Yang, and Yan-Heng Zhou. Influence of surface chemistry on adhesion and osteo/odontogenic differentiation of dental pulp stem cells. *ACS biomaterials science and engineering*, 3:1119–1128, June 2017.
- [261] Eda D. Yildirim, Robyn Besunder, Daphne Pappas, Fred Allen, Selçuk Güçeri, and Wei Sun. Accelerated differentiation of osteoblast cells on polycaprolactone scaffolds driven by a combined effect of protein coating and plasma modification. *Biofabrication*, 2:014109, March 2010.

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Kampagne zum Organspendeausweis der Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung (BZgA) . . . . .	2
1.2	Stand der aktiven Warteliste für die Organe Niere, Leber, Herz, Lunge und Pankreas des Eurotransplant Raumes im Jahr 2021 . . . . .	3
1.3	Schematische Darstellung der Systeme Einzelspende, Spenderpaare und Spenderketten am Beispiel der Nierentransplantation. . . . .	4
1.4	Schematische Darstellung der verschiedenen Ursprünge von transplantiertem Gewebe und Organen. . . . .	5
1.5	Schematische Darstellung der Ansätze des Tissue Engineering und der Regenerativen Medizin. . . . .	7
1.6	Schematische Darstellung des Ansatzes der Biofabrikation. . . . .	8
1.7	Schematische Darstellung der Tropfendruckverfahren . . . . .	9
1.8	Schematische Darstellung des akustischen Druckverfahrens. . . . .	10
1.9	Schematische Darstellung der unterschiedlichen Strangdruckverfahren . . . . .	12
1.10	Schematische Darstellung der Flächendruckverfahren SLA und DLP. . . . .	13
1.11	Schematische Darstellung des Volumendruckverfahrens CAL. . . . .	14
1.12	Schematische Übersicht der aktuell eingesetzten Biodruckverfahren nach Tropfen-, Strang-, Flächen- oder Volumendruck. . . . .	15
1.13	Schematische Darstellung der wichtigsten Einflussfaktoren bei der Konzeption einer anwendungsspezifischen Biotinte. . . . .	17
1.14	Schematische Darstellung von Faser-Matrix Interaktionsmechanismen . . . . .	21
1.15	Fasern als funktionelle Strukturelemente in natürlichem Gewebe. A: Herzmuskelzellen ändern bei Betrachtung durch die Schichtdicke kontinuierliche ihre Orientierung für gezielte Kontraktion. B: Aufbau eines Gelenkknorpels mit Anordnung der Kollagenfasern in drei Zonen mit unterschiedlichen Durchmessern und Ausrichtungen. . . . .	23

1.16	Schematische Übersicht der zentralen Arbeitspakete, Experimente und untersuchten Prozessparameter in dieser Arbeit. . . . .	27
2.1	Schematische Darstellung des Aufbaus zum elektrostatischen Faserspinnen aus Lösung. . . . .	33
2.2	Schematische Darstellung des Aufbaus zum Schmelz-Elektro-Schreib-Verfahren. . . . .	36
2.3	Schematische Darstellung der Prozessschritte in der photolithografischen Herstellung der strukturierten MEW-Kollektoren. . . . .	37
2.4	Schematische Darstellung des rheologischen Zwei-Platten-Modells und der entsprechenden Messgeometrien. . . . .	39
2.5	Zeitabhängiges Verhalten bei rheologischen Messungen. . . . .	41
2.6	Scherverdünnendes Verhalten der komplexen Viskosität im oszillatorischen Frequenztest. . . . .	42
2.7	Scherverdünnendes Verhalten von $G'$ und $G''$ im oszillatorischen Amplitudentest. Der linear-viskoelastische Bereich (LVE) endet bei überschreiten von $\gamma_{krit}$ . . . . .	43
2.8	Verhalten des Speichermoduls im Erholungsschritt. Zum Zeitpunkt $t = 0$ s endet die Belastung aus dem vorherigen Messschritt und das Schubmodul kann sich auf einen neuen Plateau-Wert erholen. . . . .	43
2.9	Im Rotationsfließtest wird eine Rampe im Scherratenbereich von $0,01$ $1/s$ bis $1000$ $s^{-1}$ gefahren und der Einfluss der Scherspannung auf die Viskosität untersucht. . . . .	44
2.10	Symbolische Darstellung der drei Grundelemente zu Beschreibung des rheologischen Verhaltens von Materialien. . . . .	47
2.11	Entwicklung der Burgers-Modell aus einer Reihenschaltung eines Maxwell-Körpers und eines Kelvin-Voigt-Körpers. . . . .	48
3.1	Repräsentative rasterelektronenmikroskopische Analysen von elektrogenesponnenen Vliesen aus PCL in HFIP. . . . .	58
3.2	Elektrogenespinnene Fasern und Faserfragmente aus unterschiedlich konzentrierten Spinnlösungen in der REM-Analyse. . . . .	59
3.3	Ergebnisse der REM-Analysen der Proben nach Tabelle 3.1. Die eingezeichneten Messbalken entsprechen $100$ $\mu m$ . . . . .	61
3.4	Einordnung der untersuchten Proben nach ihrer Gesamtkonzentration und dem mittleren Molekulargewicht. . . . .	62
3.5	REM-Analyse der systematischen Untersuchung von bimodalen Mischungen aus $10$ und $80$ kDa PCL mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen im Konzentrationsbereich von $10$ bis $30\%$ w/v. Die eingezeichneten Messbalken entsprechen $100$ $\mu m$ . . . . .	63

3.6	Vergleich der Viskosität von Spinnlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen und Molekulargewichten gemäß Tabelle 3.1 im Rotationsversuch. . . . .	64
3.7	Vergleich der Viskositätsmessungen bei drei verschiedenen Konzentrationen (15 % w/v, 20 % w/v und 25 % w/v) und verschiedenen Mischungsverhältnissen von 10 kDa PCL zu 80 kDa PCL (5:5/6:4/7:3/8:2/9:1/10:0). . . . .	65
3.8	Analysen des photolithographisch hergestellten Substrates im MEW. (A) REM-Analyse des unbenutzten Substrates mit Markierung der Stege und Zwischenräume. . . . .	67
3.9	Erwartetes Verarbeitungsfenster von PCL in der Klimakammer aufgrund von Materialparametern und Gerätespezifikationen nach Vorversuchen. . . . .	68
3.10	REM-Analyse der auf dem Substrat abgelagerten Fasern mit den Stegbreiten (A) 200 $\mu\text{m}$ , (B) 100 $\mu\text{m}$ und (C) 40 $\mu\text{m}$ . Der Stegabstand (D) beeinflusst die Durchmesser der Kugelen, wobei ein minimaler Abstand (E) für die Fragmentierung von 20 $\mu\text{m}$ ermittelt wurde. . . . .	69
3.11	REM-Analyse der Hydrogelbruchkanten mit 3 % Alginat. Repräsentative Aufnahmen der Proben in unterschiedlicher Vergrößerung bei steigendem Füllgrad an PCL-Faserfragmenten von 0 % w/v auf 10 % w/v. . . . .	71
3.12	REM-Analyse der Hydrogelbruchkanten aus 20 % Pluronic. Repräsentative Aufnahmen der Proben in unterschiedlicher Vergrößerung bei steigendem Füllgrad an PCL-Faserfragmenten von 0 % w/v auf 10 % w/v. . . . .	72
3.13	REM-Analyse der Hydrogelbruchkanten aus 3 % eADF4(C16). Repräsentative Aufnahmen der Proben in unterschiedlicher Vergrößerung bei steigendem Füllgrad an PCL-Faserfragmenten von 0 % w/v auf 10 % w/v. . . . .	73
3.14	Abhängigkeit der Porendurchmesser von der Konzentration der PCL-Faserfragmente (Durchmesser: $2,75 \pm 0,53 \mu\text{m}$ ; durchschnittliche Länge: $96,77 \pm 46,88 \mu\text{m}$ ) in Hydrogelen aus Alginat, Pluronic und eADF4(C16) (n=30). . . . .	73
3.15	Komplexe Viskosität in Abhängigkeit der Kreisfrequenz im oszillatorischen Frequenztest für die Hydrogele Alginat 3 %, Pluronic 20 % und eADF4(C16) 3 % mit einer Markierung bei 1 rad/s. . . . .	75
3.16	Komplexe Viskosität bei einer Kreisfrequenz von 1 rad/s im oszillatorischen Frequenztest für die Hydrogele Alginat 3 %, Pluronic 20 % und eADF4(C16) 3 %. Unterschiedliche Füllgrade an CeNF (grüne Balken) und PCL (blaue Balken) im Vergleich. . . . .	78
3.17	Speicher- und Verlustmodul in Abhängigkeit der Deformation im oszillatorischen Amplitudentest von unverstärktem 3 % Alginat (Kontrolle) und faserverstärktem Hydrogel mit 2 % w/v, 5 % w/v und 10 % w/v PCL-Fragmenten und 0,5 % w/v, 1 % w/v und 2 % w/v CeNF. . . . .	79
3.18	Speicher- und Verlustmodul in Abhängigkeit der Deformation im oszillatorischen Amplitudentest von unverstärktem 20 % Pluronic (Kontrolle) und faserverstärktem Hydrogel mit 2 % w/v, 5 % w/v und 10 % w/v PCL-Fragmenten und 0,5 % w/v, 1 % w/v und 2 % w/v CeNF. . . . .	80

3.19 Speicher- und Verlustmodul in Abhängigkeit der Deformation im oszillatorischen Amplitudentest von unverstärktem 3 % eADF4(C16) (Kontrolle) und faserverstärktem Hydrogel mit 2 % w/v, 5 % w/v und 10 % w/v PCL-Fragmenten und 0,5 % w/v, 1 % w/v und 2 % w/v CeNF. . . . .	81
3.20 Regenerationsverhalten der unterschiedlichen Komposit-Hydrogele nach Belastung durch den oszillatorischen Amplitudentest. Bei Sekunde 175 wird die angelegte Deformation schlagartig reduziert und das Erreichen eines neuen Plateau-Wertes beobachtet. . . . .	83
3.21 Auswertung des Regenerationsverhalten der Komposit-Hydrogele nach Reduktion der Deformation im Anschluss an den oszillatorischen Amplitudentest. Verglichen wird der Wert des Speichermoduls jeweils 10 und 30 Sekunden nach Reduktion der Deformation. . . . .	84
3.22 Viskosität in Abhängigkeit von der Scherrate im Rotationsfließversuch für die Hydrogele Alginat 3 %, Pluronic 20 % und eADF4(C16) 3 %. Untersuchte Füllgrade der Faserverstärkung 2 % w/v, 5 % w/v und 10 % w/v PCL-Fragmente und 0,5 % w/v, 1 % w/v und 2 % w/v CeNF mit unverstärkten Hydrogelen als Kontrolle. 86	86
3.23 Schematische Darstellung des Burgers-Modells. . . . .	87
3.24 Rheologische Modellparameter des integrierten Burgers-Modell in Abhängigkeit des Füllgrads der Faserverstärkung für die Hydrogele aus Alginat und Pluronic. .	88
3.25 Charakteristische Zeiten des Maxwell- und Kelvin-Voigt-Elements in Abhängigkeit des Füllgrads der Faserverstärkung von 2 % w/v, 5 % w/v und 10 % w/v PCL-Fragmenten und 0,5 % w/v, 1 % w/v und 2 % w/v CeNF für die Hydrogele aus (A) Pluronic 20 % und (B) Alginat 3 %. . . . .	90
3.26 Schematische Darstellung des Aufbaus (A) für die Aufnahme des Strangfließens von Hydrogelen auf einem modifizierten Druckbett im Querschnitt. . . . .	91
3.27 Zeitliche Entwicklung der Strangbreite nach dem 3D-Drucken für vordefinierte $\kappa$ -Werte. Dargestellt sind unterschiedlichen Füllgrade der Faserverstärkung für Alginat 3 % (A;B;C) und Pluronic 20 % (D;E;F). Verglichen werden die unverstärkten Hydrogele (A&D) mit dem jeweils maximalen Füllgrad an Faserverstärkung von 2 % w/v CeNF (B&E) und 10 % w/v PCL-Fragmenten (C&F). . . . .	93
3.28 Zeitliche Entwicklung eines gedruckten Konstrukts aus Pluronic 20 % mit Zugabe von 10 % w/v PCL-Faserfragmenten. Im Zeitintervall von 20 s kollabiert der gedruckte Hohlzylinder komplett und bildet einen Tropfen. . . . .	94
3.29 Repräsentative Aufnahmen der Zellbesiedlung auf unterschiedlich beschichteten PCL-Fragmenten auf einem Trägervlies. Verglichen wird die (A) Kontrollgruppe mit (B) unbeschichteten, (C) plasmabehandelten, (D) fibronektin- und (E) kollagenbeschichteten Faserfragmenten. . . . .	95
3.30 Zellviabilität von BALB/3T3-Fibroblasten auf PCL-Faserfragmenten mit unterschiedlicher Beschichtung (unbeschichtet/Plasma/Fibronektin/Kollagen) im Vergleich zur beschichteten Zellkulturplatte als Positivkontrolle (n=7). . . . .	96

3.31	Schematische Darstellung der einzelnen Schritte und der beteiligten chemischen Gruppen bei der Kollagenbeschichtung von PCL-Faserfragmenten. . . . .	97
3.32	EDX-Analyse der PCL-Faserfragmente vor und nach dem ersten Prozessschritt der Beschichtung, der Behandlung mit 1,6-Hexandiamin. Markierungen bei 284 eV (Kohlenstoff), 400 eV (Stickstoff) und 540 eV (Sauerstoff). . . . .	97
3.33	FTIR-Analyse von (A) unbeschichteten PCL-Fasern, (B) beschichteten PCL-Fasern und (C) reinem Kollagen. . . . .	98
3.34	REM-Analyse der vereinzelt PCL-Fragmente (A) vor und (B) nach der Kollagenbeschichtung. Repräsentative Aufnahmen von (C) Kollagenfibrillen auf der Oberfläche der PCL-Fragmente sind mit Pfeilen markiert. . . . .	99
3.35	Repräsentative makroskopische Aufnahmen der Kontaktwinkelmessung von (A) unbeschichteten und (B) kollagenbeschichteten PCL-Vliesen. . . . .	100
3.36	Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von BALB/3T3-Fibroblasten nach 72 Stunden in Kontakt mit PCL-Faserfragmenten. . . . .	101
3.37	Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von BALB/3T3-Fibroblasten nach 72 Stunden in Kontakt mit PCL-Faserfragmenten. Zellen, die an mehreren Fasern gleichzeitig anhaften, zeigen eine erhöhte Zellmortalität. . . . .	101
3.38	Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von BJ-Fibroblasten nach 72 Stunden auf (A) beschichteten Zellkulturplatten und (B) in Kontakt mit PCL-Faserfragmenten. . . . .	102
3.39	Repräsentative Fluoreszenz-Zeitrafferaufnahmen der Interaktion von FUCCI-Tumorzellen mit PCL-Faserfragmenten. . . . .	103
3.40	Repräsentative Fluoreszenz-Zeitrafferaufnahmen der Interaktion von FUCCI-Reporterzellen mit PCL-Faserfragmenten. . . . .	104
3.41	Repräsentative REM-Analysen von kollagenbeschichteten elektrogewebenen Vliesen nach Kultivierung von U87-Reporterzellen auf der Oberfläche. Die untersuchten Morphologien sind (A) zufällig angeordnete Endlosfasern, (B) ausgerichtete Endlosfasern, (C) ausgerichtete Fasern und Fragmente und (D) zufällig angeordnete Fragmente. . . . .	105
3.42	Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der U87-Reporterzellen auf (A) gemischter Morphologie aus PCL-Fasern und Fragmenten und (B) nur auf Fragmenten. Die F-actin Färbung ist in in den Aufnahmen grün dargestellt, tdTomatoe-farnesyl in rot. . . . .	106
3.43	Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von U87-Reporterzellen auf elektrogewebenen Vliesen aus PCL-Fragmenten in (A) zufälliger Anordnung und (B) axialer Ausrichtung. . . . .	107
4.1	REM-Analyse einzelner repräsentativer Übergangszustände zwischen Faser und Fragment aus PCL im elektrostatischen Faserspinnen aus Lösung. Der abgebildete Maßstabsbalken entspricht 5 $\mu\text{m}$ . . . . .	110

4.2	Retuschierte Darstellung der entstehenden Morphologien in Abhängigkeit des Molekulargewichts des verwendeten PCL und der Polymerkonzentration in der Spinnlösung auf dem Kollektornetz. In einem kleinen Prozessfenster können Faserfragmente hergestellt werden. Eine Variation der Prozessparameter führt zu Mikrokugeln oder kontinuierlichen Fasern. . . . .	111
4.3	Schematische Darstellung der einstellbaren Parameter, die die Viskosität der Spinnlösung und die hergestellten Morphologien beeinflussen. . . . .	112
4.4	Schematische Darstellung möglicher Kettenlängenverteilungen in drei Polymeren mit gleichem gewichtsmittleren Molekulargewicht. Die Verteilungen werden als (A) monodispers/monomodal eng, (B) monodispers/monomodal breit und (C) polydispers oder bimodal klassifiziert. . . . .	113
4.5	Schematische Darstellung des Plastifizierungseffekts. In einem monodispersen System (linke Seite) mit langkettigen Polymeren treten viele Verschlaufungen auf. Die Zugabe des gleichen Polymers mit kurzen Ketten (rechte Seite) kann die Flexibilität des Polymersystems erhöhen, da sich die kurzen Ketten in die Zwischenräume einlagern. . . . .	113
4.6	Vergleich der Viskosität von Spinnlösungen bei einer Scherrate von $10 \text{ s}^{-1}$ und der erzeugten Morphologie von (gelb) Kugeln, (grün) Fragmenten und (blau) Fasern. Die schraffierte Fläche zeigt den Bereich, in dem Fragmente erzeugt werden können. . . . .	114
4.7	Schematische Darstellung des Elektrosplinnprozesses, unterteilt in Bereiche, in denen potenziell Faserfragmentierung auftreten kann. . . . .	115
4.8	Schematische Betrachtung des Polymerstrahls im Bereich (A) des Taylorkonus, (B) des Auftretens von Rayleigh-Plateau-Instabilitäten, (C) der Bildung von Übergangszuständen und Kugeln und (D) der Wiederaufspaltung der Polymertröpfchen. . . . .	116
4.9	Schematische Darstellung des Jet-Splitting eines Polymerstrahls im Bereich (A) des Taylorkonus, (B) flüssigkeitsdominierten Verhaltens und (C) des Übergangs zum Trocknungsdominierten Bereich, in dem die Aufspaltung des Polymerstrahls stattfindet. . . . .	117
4.10	Schematische Darstellung des Polymerstrahls beim Sprödbbruch. Im trockenungsdominierten Bereich erzeugen die Biegeinstabilitäten aufgrund der elektrischen Ladung an der Oberfläche hohe Scherkräfte, die bei ungenügender Faserelastizität zum Sprödbbruch führen. . . . .	118
4.11	Fließschema der stabilisierenden und destabilisierenden Effekte der Bildung von Faserfragmenten infolge der Verdampfung des Lösungsmittels. Die Pfeile in den Kästchen zeigen jeweils an, ob die entsprechende Größe zunimmt (Pfeil nach oben) oder abnimmt (Pfeil nach unten). . . . .	120
4.12	Schematische Darstellung der Gradienten an PCL-Konzentration, Temperatur und daraus folgend Viskosität, die durch Verdampfen des Lösungsmittels HFIP über den Faserquerschnitt (Radius $r$ ) aufgebaut werden. . . . .	121
4.13	Schematische Darstellung der Faser- und Fragmentbildung in Abhängigkeit von der Strukturierung der Kollektoroberfläche. . . . .	122

4.14	Schematische Darstellung der Morphologie der abgelegten Faser im Schmelz-Elektro-Schreibverfahren in Abhängigkeit vom Stegabstand. . . . .	125
4.15	Erzeugte Morphologie in Abhängigkeit von Umgebungs- und Schmelztemperatur.	126
4.16	Verhältniss aus Kugel- zu Faserdurchmesser (K/F-Verhältnis) der Fragmente in Abhängigkeit vom Abstand der Stege auf dem Kollektor. Einteilung in die Bereiche (A) unter 20 $\mu\text{m}$ , (B) 20 bis 85 $\mu\text{m}$ und (C) ab 85 $\mu\text{m}$ . . . . .	128
4.17	Überblick über die in der Literatur beschriebenen Messverfahren zur Bestimmung der Druckbarkeit von Hydrogelen in der Biofabrikation. . . . .	131
4.18	Vergleichende Darstellung numerisch und experimentell ermittelter Werte der Strangbreite für unverstärktes und faserverstärktes Alginate 3% Hydrogel. Regressionsgerade (rote Linie) zur Beurteilung des linearen Zusammenhangs der numerischen ( $d_c$ ) und experimentell ( $d_m$ ) ermittelten Strangbreite im Equilibrium.	139
4.19	Darstellung von Fasereigenschaften die nachweisbaren Einfluss auf die Zellinteraktion und das langfristige Zellverhalten ausüben. . . . .	142
4.20	Schematische Darstellung der Besiedelung von Makrofasern, Mikrofasern und Nanofasern durch Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. . . . .	150

# Tabellenverzeichnis

2.1	Übersicht über die gebräuchlichsten Modelle zur Beschreibung rheologischer Messungen. Die Modelle von Power-Law, Cross und Carreau-Yasuda sind mit den entsprechenden Gleichungen aufgeführt. . . . .	44
2.2	Datenstruktur aus der Berechnung der rheologischen Messungen. . . . .	46
2.3	Übersicht der am häufigsten verwendeten rheologischen Modelle und Angabe der entsprechenden Differenzialgleichung für 2 oder 3 maßgebliche Einflussgrößen. . .	48
2.4	Übersicht der am häufigsten verwendeten rheologischen Modelle und Angabe der entsprechenden Differenzialgleichung für 3 oder 4 maßgebliche Einflussgrößen. . .	49
3.1	Versuchsmatrix zur Untersuchung des Zusammenhangs der Morphologie aus unterschiedlichen Molekulargewichten und Konzentrationen der PCL-Spinnlösung (n=100). . . . .	60
3.2	Modellparameter nach Carreau-Yasuda für die Proben mit Alginat. . . . .	76
3.3	Power-Law-Parameter der untersuchten Proben mit Alginat. Die mit * markierten Werte entsprechen der Nullviskosität und dem Power-Law-Index aus der Carreau-Yasuda-Modellierung und werden hier vergleichend aufgeführt. . . . .	76
3.4	Power-Law-Parameter der untersuchten Proben mit Pluronic. . . . .	77
3.5	Power-Law-Parameter der untersuchten Proben mit eADF4(C16). . . . .	77
3.6	Vergleich des Bestimmtheitsmaßes bei verschiedenen rheologischen Modellen für Alginat und PCL. . . . .	87
4.1	Übersichtstabelle über die in der Literatur verwendeten Kombinationen von Methoden zur Bestimmung der Druckbarkeit von Hydrogelen. . . . .	136

# Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
$A$	Fläche ( $\text{m}^2$ )
$a$	Spaltabstand (m)
ACL	Anterior Cruciate Ligament
AFA-LIFT	Absorbing Film Assisted-Laser-Induced Forward Transfer
ATR	Attenuated Total Reflectance
BALB	Bagg Albino
BSE	Backscattered Electrons
CAL	Computed Axial Lithography
calcein AM	Calcein Aceroxymethylester
CeNF	Cellulose Nanofibers
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
CRISPR/Cas	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CT	Computertomographie
$d$	zeitabhängige Strangbreite (mm)
dECM	Decellularized Extracellular Matrix
DLP	Digital Light Processing
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyrdeoxyribonucleic Acid
$E$	Elastizitätsmodul (Pa)
EBSD	Electron Backscatter Diffraction
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
ECM	Extracellular Matrix
EDX	Energy-dispersive X-ray spectroscopy
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
EPO	Erythropoetin
$F$	Scherkraft (N)
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy
FUCCI	Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator
$G$	Schermodul (Pa)
$G^*$	komplexer Modul (Pa)
$G'$	Speichermodul (Pa)
$G''$	Verlustmodul (Pa)
GelMA	Gelatin-methacryloyl
$h$	Plattenabstand (m)
HA	Hyaluronic Acid
HAMA	Hyaluronic Acid Methacrylate
hASC	Human Adipose-Derived Stem Cells
HFIP	Hexafluoroisopropanol
hiPSC	Human-induced Pluripotent Stem Cells
hMSC	Human Mesenchymal Stem Cells
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells

<b>Abkürzung</b>	<b>Erläuterung</b>
LAP	Lithium-Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat
LIFT	Laser-Induced Forward Transfer
LIST	Laser-Induced Side Transfer
MAPLE-DW	Matrix-Assisted Pulsed-Laser Evaporation Direct Write
MEW	Melt Electrowriting
MTGase	Microbial transglutaminase
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
NGS	Normal Goat Serum
PA 6.6	Polyamid 6.6
PBS	Phosphate-buffered saline
PCL	Polycaprolacton
PDGF	Platelet-derived growth factor
PEGDA	Polyethylene Glycol Diacrylate
PFA	Paraformaldehyde
PTFE	Polytetrafluorethylen
$R$	Radius (m)
REM	Rasterelektronenmikroskop
RGD	Aminosäuresequenz aus den drei L-Aminosäuren Arg-Gly-Asp
SLA	Stereolithography
$t$	Zeit (s)
U87	Human Glioblastome Cell Line
UCSF	University of California, San Francisco
UV-A	Ultraviolettstrahlung im Wellenlängenbereich 380-315 nm
$v$	Geschwindigkeit (m/s)
VEGF	vascular endothelial growth factor
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy
$\alpha$	Kegelwinkel (rad)
$\delta$	Winkelversatz (rad)
$\dot{\gamma}$	Scherrate (1/s)
$\eta$	Scherviskosität (Pa·s)
$\varepsilon$	Deformation (%)
$\kappa$	theoretische Querschnittsfläche (mm <sup>2</sup> )
$\nu$	kinematische Viskosität (Pa·s)
$\omega$	Frequenz (1/s)
$\rho$	Dichte (g/cm <sup>3</sup> )
$\sigma$	Spannung (Pa)
$\tau$	Scherspannung (Pa)

# Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Mentor Gregor Lang bedanken, der mich durch seine Unterstützung, Anleitung und Ermutigung maßgeblich dazu befähigt hat, diese Doktorarbeit erfolgreich zu absolvieren. Ich schätze die Freiheit, die er mir gegeben hat, um meine eigenen Ideen und Theorien im Labor und innerhalb des Projektes zu erforschen und zu entwickeln. Dadurch konnte ich eine einzigartige Perspektive auf dieses faszinierende Forschungsfeld der Biofabrikation und ihrer Möglichkeiten gewinnen. Seine Fähigkeit, komplexe wissenschaftliche Konzepte auf verständliche Weise zu erklären und seine Fähigkeit, meine Ideen zu fördern, haben dazu beigetragen, dass ich das Beste aus meiner Arbeit herausholen konnte. Vielen Dank für die gemeinsamen Erlebnisse, sei es beim Schnorcheln in Australien oder bei den entspannten Gesprächen nach der Arbeit.

Vielen Dank an die Prüfungskommission, an Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheibel, der mir als Zweitgutachter zur Seite stand und unsere kleine Arbeitsgruppe immer herzlich in seinen Lehrstuhl integrierte, an Prof. Dr.-Ing. Frank Döpfer als weiteren Prüfer und an Prof. Dr.-Ing. Gerhard Fischerauer als Vorsitzenden der Prüfungskommission.

Ich möchte darüber hinaus der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) meinen Dank aussprechen, die mir im Rahmen des SFB TRR 225 eine außergewöhnliche Chance geboten hat, mit einer Vielzahl an hervorragenden Wissenschaftlern zusammenzuarbeiten und mich in diesem interdisziplinären Forschungsprojekt einbringen zu können. Die Möglichkeit, mich mit anderen Doktoranden und erfahrenen Wissenschaftlern regelmäßig bei Klausurtagungen, Summer Schools und Laborbesuchen auszutauschen, hat meine Arbeit ungemein bereichert. Ich bedanke mich bei all meinen Doktorandenkollegen des SFB, ihr seid ein großartige Truppe und ich hoffe wir sehen uns bald wieder.

Ein riesiges Dankeschön an meine fleißigen Korrekturleser Lukas, Jürgen, Kim und Rebekka, die sich mit meinen halbfertigen (und fast-fertigen) Fassungen rumschlagen mussten und mir wertvolles Feedback gegeben haben um am Ende tatsächlich eine komplette Arbeit schreiben zu können.

Ein herzlicher Dank geht an Kim und Vanessa für den wunderbaren Beginn meiner Promotionszeit mit einem Fiat 500 in Trento sowie für den ebenso schönen Abschluss auf Vespas am Lago di Como.

Vielen Dank Vanessa und Sarah für die unvergessliche Zeit in Australien und Tasmanien, den Great Ocean Road-Trip und die kleineren Nervenzusammenbrüche aller Beteiligten, bei denen wir uns immer gegenseitig unterstützt haben.

A huge thank you goes to my Colombian friends Juan and Andres, who brightened my time at LT with their cheerful moods, eloquent conversations, unquenchable thirst for cool drinks and craving for power pizzas.

Großen Dank auch an meine Studenten Kalle, Claudia, Sabrina, Carmen, Taghi, Saurav, Yanis, Fabien, Melissa, Patrick, Leonie, Prince, Razan, Christoph, Songchen, Gadha, Raneem, Shubham, Anna-Lena, Satish und Peter, die ich während meiner Promotion betreuen durfte. Ich hoffe ihr habt auch nur Ansatzweise so viel von mir gelernt wie ich von euch.

Ein Danke geht an die natürlich besten TA's der Welt Anderl, Johannes, Nicole, Alex und Heike, die den Laden immer am laufen halten und ohne die nichts gehen würde. Vielen Dank auch an alle Kollegen des Lehrstuhls Biomaterialien, ich hab mich bei euch immer herzlich aufgenommen

gefühlt wenn ich den weiten Weg über den Campus zu euch geschafft habe.

Ich danke allen meinen Freunden für die Unterstützung in den letzten Jahren und all die schönen Ablenkungen neben der Arbeit.

Ein riesiges Dankeschön an meine Familie, an Teresa, Lucas und Frido, die einfach die süßeste kleine Familie sind die man sich vorstellen kann und an meine Eltern Peter und Johanna. Ihr stärkt mir immer den Rücken und habt mich von Anfang an unterstützt, meine Träume zu verfolgen. Ihr habt mich dazu ermutigt, mein Bestes zu geben und mich selbst immer wieder herauszufordern. Ihr habt mich zu dem gemacht, was ich heute bin, und ich danke euch von ganzem Herzen für eure Unterstützung und Liebe. So Mama, jetzt hob I a endlich mein Doktorzettel!

Der mit Abstand größte Dank gebührt meiner Freundin Rebekka, die in dieser Zeit immer für mich da war. Deine Geduld (meistens) und dein Verständnis (immer) haben mir geholfen, durch die stressigen und anstrengenden Zeiten der Doktorarbeit zu kommen. Du hast mir den Rücken freigehalten, während ich mich auf meine Arbeit konzentriert habe, und hast mir gelegentlich einen Stupps in die richtige Richtung gegeben, wenn ich Motivation gebraucht hab. Ohne deine Unterstützung und deine Liebe hätte ich diese schwierige Zeit nicht gemeistert. Du hast mir immer Mut gemacht, wenn ich Zweifel hatte, und hast mir geholfen, den Überblick zu behalten, wenn ich mich verloren gefühlt habe. Ich weiß, dass du in dieser Zeit auf vieles verzichten musstest und ich danke dir von ganzem Herzen dafür. Jetzt können wir einen Urlaub planen, versprochen.

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle wörtlichen oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ferner erkläre ich, dass diese Dissertation nicht bereits an anderer Stelle eingereicht wurde oder von anderer Stelle endgültig abgelehnt wurde. Ich versichere, dass ich weder diese noch eine gleichartige Promotionsprüfung endgültig nicht bestanden habe.

Zudem erkläre ich, dass ich weder in der Vergangenheit Hilfe von einem gewerblichen Promotionsberater-bzw. -vermittler in Anspruch genommen habe, noch künftig in Anspruch nehmen werden.

---

Ort, Datum

---

David Sonnleitner