universität wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Herstellung und Charakterisierung eines Biomaterials zur Austestung an Osteoblasten“

verfasst von / submitted by

Anna Wolfertsberger

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015 / Vienna, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt / degree programme code as it appears on the student record sheet:	A 449
Studienrichtung lt. Studienblatt / degree programme as it appears on the student record sheet:	Diplomstudium Pharmazie
Betreut von / Supervisor:	Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Oskar Hoffmann

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Danksagung

Ein herzliches Dankeschön gilt, allen voran Professor Oskar Hoffmann, der mir die Möglichkeit gab, diese Diplomarbeit in einem hervorragenden Labor und einem außerordentlich tollen Team durchzuführen. Besonders für die Zuweisung des interessanten Themas und die gute Betreuung während der Arbeit sowie der Hilfestellung und Motivation bei immer neuen Herausforderungen möchte ich mich sehr bedanken. Mir wurde ein weitreichender, faszinierender Einblick ins wissenschaftliche Arbeiten ermöglicht.

Für die Aufnahmen der ^{1}H-NMR-Spektren, sowie für die Hilfestellung bei deren Interpretation möchte ich mich bei Professor Ernst Urban sehr herzlich bedanken.

Frau Mag. Carina Kampleitner war als direkte Ansprechpartnerin stets eine riesengroße Stütze und hat mir durch ihr Engagement und fachliche Kompetenz an vielen Stellen weitergeholfen. Danke!

Danke - Thank You - auch an Dr. Tristan Fowler und Dr. Christian Richard, die mir fachlich mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind. Ich konnte meine Englisch-Kenntnisse durch den ständigen Austausch in dieser Sprache enorm verbessern.

Das Arbeiten im Labor ohne den helfenden Einsatz von Frau Barbara Berger, Herrn Peter Höflich, Frau Yvonne Kosch oder Frau Beata Gaisbauer kann ich mir kaum vorstellen! Danke, dass ich so herzlich ins Team aufgenommen wurde.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie, die mir dieses Studium durch den nötigen Rückhalt überhaupt erst ermöglicht hat. Mama und Papa danke ich dafür, dass sie mir alle Türen geöffnet haben, mir mein eigenes Leben aufzubauen und sie dabei stets an mich geglaubt haben. Auch die zahlreichen blaugedrückten Daumen meiner Großmutter gaben mir oft Kraft.

Der größte Dank gebührt allerdings meiner Schwester Christina, die mir durch ihre unendliche Zuversicht und ihren Zuspruch immer wieder Mut machte, wenn etwas nicht den gewünschten Verlauf genommen hatte und immer ein offenes Ohr für meine Anliegen hatte.

Liste der verwendeten Abkürzungen

1α,25-$(OH)_2$-Vit. D_3	1α,25-Dihydroxy-Vitamin-D_3
α-MEM	α-Minimal Essential Medium
Abb.	Abbildung
ALP	Alkalische Phosphatase
ARS	Alizarin Rot S
BCIP	5-Brom-4-chlor-3'-indolylphosphat
BMP	Bone Morphogenetic Protein
Ca	Kalzium
CO_2	Kohlenstoffdioxid
D_2O	Deuteriumoxid
DS	Substitutionsgrad (Degree of Substitution)
FCS hi	Foetal Calf Serum, heat inactivated
FGF	Fibroblast Growth Factor
GelB	Gelatine Typ B
GelMA	methacrylierte Gelatine B
GF	Gelfraktion
β-GP	β-Glycerophoshat
h	Höhe
H	Wasserstoff
HCl	Salzsäure
IL-1	Interleukin-1
KM	Kulturmedium
LAF	Laminar Air Flow
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MM	Mineralisationsmedium

NaOH..... Natriumhydroxid, Natronlauge

NBT ..... Nitro-Blue-Tetrazolium

NMR ..... Nuclear Magnetic Spin Resonance

OB ..... Osteoblasten

OC ..... Osteoklasten

OPG..... Osteoprotegerin

P/S..... Penicillin/Streptomycin

PBS ..... Phosphate Buffered Saline

PI ..... Photoinitiator

PTH ..... Parathormon

QF ..... Quellungsfaktor

RANKL..... Receptor Activator of NF-κB Ligand

SDS ..... Sodiumdodecylsulfat

SEM..... Standard Error of the Mean

TGF-β ..... Transforming Growth Factor β

TNBS 2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure

UV ..... Ultraviolett

Vit.C..... Vitamin C, Ascorbinsäure

WST-1 ..... Water Soluble Tetrazolium-1 Salz

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 13

1.1 Knochenphysiologie 13

1.2 Knochenzellen 14

1.2.1 OB, Osteozyten, Saumzellen 14

1.2.2 OC 15

1.3 Signalwege bei der Knochenumbildung 16

1.3.1 OC-Aktivität 16

1.3.2 OB-Aktivität 16

1.3.3 Osteozytenaktivität 17

1.4 „Bone Tissue Engineering“ 18

1.4.1 Biomedizinische Relevanz des „Bone Tissue Engineering“ 18

1.4.2 Künstliches Knochenmaterial 18

1.4.3 Biomaterialien 19

1.5 Hydrogele 20

1.5.1 Hydrogele für das „Bone Tissue Engineering“ 20

1.5.2 Hybrid-Hydrogele 21

1.5.3 Radikalische Polymerisation, Photopolymerisation 21

1.6 Biopolymer Gelatine 22

2 Material und Methoden 23

2.1 Versuchsaufbau 23

2.2 Methacrylierte Gelatine B (GelMA) 25

2.2.1 Synthese der GelMA 25

2.2.2 Durchführung der Substitution von Gelatine B mit Methacryl-Gruppen 25

2.2.3 Charakterisierung von GelMA 26

2.3 Hydrogelherstellung durch UV-Photopolymerisation 31

2.3.1 Berechnung der PI-Konzentration 31

2.3.2 Herstellung der PI-Lösungen 31

2.3.3 Herstellung der 10 % GelMA-Lösungen 32

2.3.4 Strategien zur Herstellung runder Hydrogele 32

2.3.5 UV-Photopolymerisation der 10 % GelMA-Lösungen zu Hydrogelen 34

2.3.6 Vorbereitung der Hydrogele für zelluläre Experimente 34

2.4 Charakterisierung der Hydrogele nach erfolgter Polymerisation 35

2.4.1 Berechnung der GF 35

2.4.2 Berechnung des QF 35

2.5 Zellviabilitätstest (WST-1-Assay) 36
2.6 Kultivierung von primären OB 38
2.6.1 Kultivierung von primären OB 38
2.6.2 Zellaussaat auf Gewebekultur-Deckglasbeschichtungen 38
2.6.3 Zellaussaat auf Hydrogelplättchen 38
2.6.4 Mineralisationsassay 39
2.6.5 Ca-Assay 41
2.6.6 Alizarin Rot S (ARS)-Färbung 43
2.6.7 Von Kossa-Färbung 43
2.7 Statistische Auswertung 44
2.8 Herstellung der Nährmedien 45
2.8.1 Kulturmedium 45
2.8.2 Mineralisationsmedium 45
2.9 Reagenzienherstellung 45
2.9.1 Alizarin Rot S-Farblösung (40 mM) 45
2.9.2 Ascorbinsäure-Stammlösung (100x Vit.C) 45
2.9.3 BCIP/NBT-Farbreagens 45
2.9.4 0,5 N Essigsäure 45
2.9.5 FCS hi 46
2.9.6 3,7 % Formaldehydlösung 46
2.9.7 β-Glycerophosphat-Stammlösung (100x β-GP) 46
2.9.8 5 % Natriumthiosulfat-Lösung 46
2.9.9 PBS 46
2.9.10 Phosphatpuffer pH 8,5 46
2.9.11 10 % SDS-Lösung 46
2.9.12 1 N HCl 47
2.9.13 5 % Silbernitrat-Lösung 47
2.9.14 0,1 % TNBS-Lösung 47
2.9.15 Waschpuffer 47
2.10 Reagenzien 48
2.11 Materialien 50
2.12 Geräte 51
3 Resultate 53
3.1 Synthese und Charakterisierung von GelMA 55
3.1.1 Produktausbeute der GelMA-Synthese 55

3.1.2 Produktanalyse mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie.....55
3.1.3 Ermittlung des DS mittels Habeeb-Test.....57
3.1.4 Vergleich der Werte für den DS ermittelt durch zwei unterschiedliche Methoden (^{1}H-NMR-Spektroskopie und Habeeb-Test).....58
3.2 Methodenoptimierung zur UV-Photopolymerisation der GelMA.....64
3.2.1 Methodenoptimierung zur Hydrogelherstellung 64
3.2.2 Charakterisierung der Hydrogele mittels GF und QF.....69
3.3 Methodenoptimierung zur Zellaussaat auf den Hydrogelen 70
3.3.1 Zellaussaat auf Deckglasbeschichtungen 70
3.3.2 Zellaussaat auf ausgestanzten Hydrogelplättchen 71
3.4 Einflüsse der Hydrogel-Komponenten auf die Zellviabilität von primären OB mittels WST-1-Assay 73
3.4.1 Einfluss des inaktiven und aktivierten PI Irgacure 2959 auf die Viabilität primärer OB 73
3.4.2 Einfluss von GelMA-Lösungen auf die Viabilität primärer OB 75
3.5 *In-vitro* Austestung der Hydrogele an primären OB 76
3.5.1 Effekt der Deckglasbeschichtung auf die Differenzierung und Mineralisation extrazellulärer Matrix von primären OB 76
3.5.2 Effekt der Hydrogelplättchen auf die Differenzierung und Mineralisation von primären OB.....77
3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse 81
3.6.1 Synthese, Charakterisierung und Photopolymerisation von GelMA 81
3.6.2 Einflüsse der Hydrogel-Komponenten auf die Zellviabilität von primären OB mittels WST-1-Assay.....81
3.6.3 Austestung der GelMA-Hydrogele in Zellversuchen an primären OB 81
4 Diskussion.....83
5 Abstract 89
6 Abstract (deutsch) 90
7 Abbildungsverzeichnis.....91
8 Tabellenverzeichnis.....93
9 Literaturverzeichnis.....95
10 Curriculum Vitae 99

Zielsetzung

Im medizinischen Bereich stellen schwere Knochenverletzungen eine besondere Herausforderung dar, da oft Knochenersatzmaterialien benötigt werden, hier aber nach wie vor limitierende Faktoren wie rasche Verfügbarkeit der Transplantate oder individuelle Formgebung zu massiven Problemen führen können. Hydrogele sind Biomaterialien, die sich durch eine Vielfalt an Verwendungsmöglichkeiten auszeichnen und bieten auf dem Gebiet des „Bone Tissue Engineering“ interessante Einsatzmöglichkeiten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Hydrogel hergestellt, das hinsichtlich seiner mechanischen Eigenschaften sowie der Beeinflussung des Wachstums von primären Osteoblasten (OB) getestet wurde, wobei deren Zellviabilität, Differenzierung und Mineralisationsfähigkeit mit geeigneten Methoden charakterisiert wurden. Das entwickelte Hydrogel stellt wegen seiner osteokondukiven Eigenschaften ein geeignetes Biomaterial für den Einsatz in Knochenersatzmaterialien dar.

Die Aussicht, dass für schwerwiegende Knochenschäden in Zukunft eine bessere Heilungsmöglichkeit bestehen könnte, macht das „Bone Tissue Engineering“ durch die immer älter werdende Gesellschaft, in welcher solche Verletzungen gehäuft vorkommen, zu einem wichtigen Forschungsgebiet.

1 Einleitung

1.1 Knochenphysiologie

Knochen sind elementare Bestandteile des Skeletts. Sie tragen eine wichtige Stützfunktion für den Körper, ermöglichen die Ausführung gezielter Bewegungen und schützen innere Organe sowie das Nervensystem vor mechanischer Zerstörung (Imai, et al. 2013). Knochengewebe ist starr, besitzt aber trotzdem durch ständige Umstrukturierung eine dynamische Charakteristik und besteht aus einer Mischung anorganischer (Kalziumphosphat, Hydroxyapatit) und organischer Elemente (Kollagen). Es dient als Mineralstoffspeicher für den Körper und besitzt als endokrines Organ regulatorische Funktionen, die während des Knochenaufbaus das Körperwachstum anregen und welche in reifen Knochen den Mineralhaushalt steuern (Harada and Rodan 2003), (Fukumoto and Martin 2009). Die stetige Erneuerung der Knochensubstanz fällt unter den Begriff „Bone Remodelling“ und bedarf komplexer Regelungsmechanismen. Für die Koordination dieser vielschichtig verknüpften Vorgänge sind lokale als auch systemische Faktoren nötig (Alexander, et al. 2009), (Hill 1998).

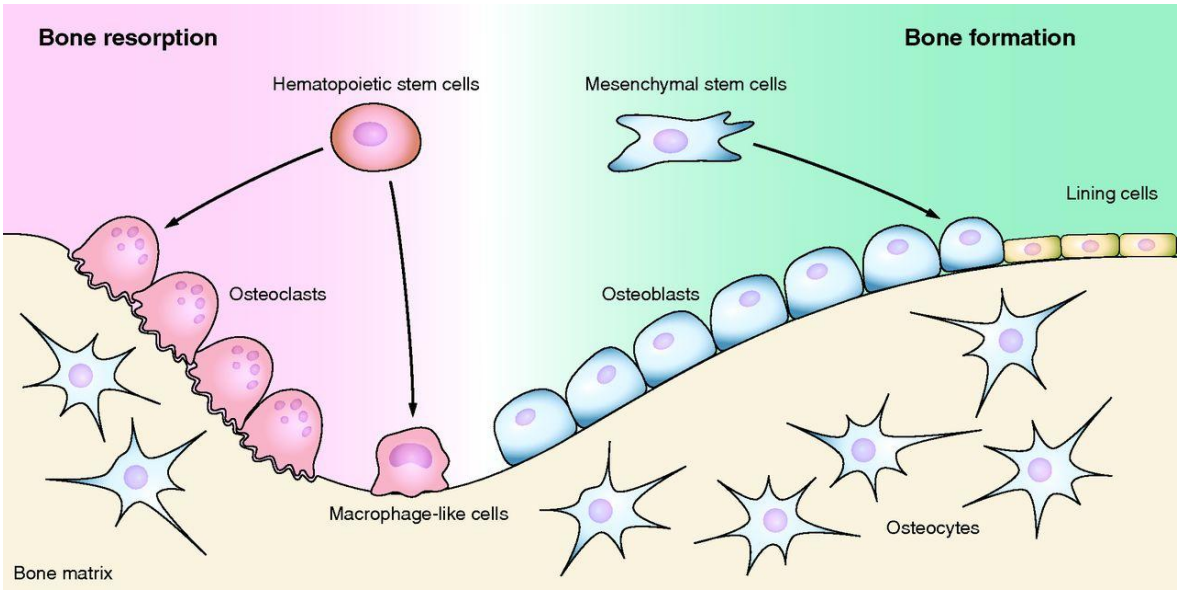

Abb. 1: Schematische Darstellung von Knochenzellen, deren Hauptfunktion und zellulärer Ursprung (Imai, et al. 2013).

1.2 Knochenzellen

An der Knochenphysiologie beteiligt sind zwei Kategorien von Knochenzellen. Auf der knochenbildenden Seite stehen die Osteoblasten (OB), zu deren Familie man auch die Osteozyten und Saumzellen zählt. Dem gegenüber stehen die knochenresorbierenden Osteoklasten (OC) (Nakahama 2010).

1.2.1 OB, Osteozyten, Saumzellen

OB stellen den einzigen Zelltyp dar, der dazu in der Lage ist, Knochen zu bilden (Pittenger, et al. 1999), (Dennis, et al. 1999). Sie sind kuboidal geformte Zellen, die an jenen Knochenoberflächen zu finden sind, an denen der Knochenaufbau stattfindet. Dabei werden Proteine des Osteoids (extrazelluläre Knochenmatrix) produziert, wie Typ-I-Kollagen, dem Hauptbestandteil des Knochens und nichtkollagenöse Proteine, wie Osteocalzin und Osteopontin sowie alkalische Phosphatase (Teti 2011). Die hohe Expression an alkalischer Phosphatase ist ein wichtiges Charakteristikum reifer OB und fördert die Mineralisation (Clarke 2008), bei der es zur Einlagerung von Hydroxyapatit in die Knochenmatrix kommt, indem Kalzium und Phosphat gebunden werden (Wennberg, et al. 2000). OB leiten sich von mesenchymalen Stammzellen ab, aus denen auf anderen Differenzierungswegen auch Chondrozyten, Myoblasten und Adipozyten entstehen können (Imai, et al. 2013). Bei der Differenzierung von OB werden vier Reifungsstadien durchlaufen. Zunächst differenzieren Osteoprogenitorzellen zu Präosteoblasten, die sich bei entsprechender Stimulation (BMP, TGF-β) zu reifen OB entwickeln. Im weiteren Verlauf werden diese entweder durch Apoptose abgebaut oder aber zu Osteozyten oder Saumzellen weiterentwickelt (Teti 2011).

Osteozyten stellen ein Endstadium der Differenzierung von OB dar. Sie werden in die Knochenmatrix eingelagert und auf diese Weise zu einem Bestandteil von neu gebildeter Knochensubstanz, von der sie den Hauptanteil einnehmen, und sind über zytoplasmatische Ausläufer, den Canaliculi, mit benachbarten Zellen verbunden (Bonewald 2011). Durch ihre mechano-sensorische Funktion können Osteozyten regulatorisch auf den Knochen- und Mineralstoffwechsel einwirken, indem sie durch ein Signal an OB (Sclerostin) den Knochenumbau einleiten (Bonewald 2007), (Duncan and Turner 1995).

Saumzellen oder „Bone Lining Cells“ sind die zweite Art terminal differenzierter OB, die an der Oberfläche des Knochens anliegen. Sie sollen hier vor resorptivem Einwirken durch OC schützen und liegen daher an Stellen des Knochens, an denen gerade kein Abbau stattfindet (Kular, et al. 2012).

1.2.2 OC

Anders als die bisher beschriebenen Knochenzellen entstammen OC hematopoietischen Stammzellen der Monozyten-/ Makrophagen-Linie. Sie sind vielkernige Zellen mit der Aufgabe, Knochenmaterial zu resorbieren. Die Differenzierung zu reifen OC erfolgt durch die Fusion von einkernigen Vorläuferzellen, den Präosteoklasten. Dieser Schritt ist Voraussetzung für die resorptive Aktivität und kann nur bei entsprechender Stimulation (M-CSF, RANKL) erfolgen (Imai, et al. 2013). Nachdem die Resorption aktiviert wurde, werden Präosteoklasten rekrutiert und ihre Fusion vorangetrieben (Kim, et al. 2005), (Yu, et al. 2004). Das Zytoskelett reifer OC wird nun umstrukturiert, sodass Polarisation erfolgt, wobei an der Plasmamembran unterschiedliche Domänen ausgebildet werden. Auf Knochenseite findet man die „ruffled borders“, an denen die Resorption erfolgt. Nach außen entsteht die „sealing zone“, welche die Umgebung des OC von dem zum Knochenabbau erforderlichen sauren Milieu abschirmt. (Li, et al. 2006).

Die nach innen gewölbten Stellen in den Knochen, an denen der Umbau erfolgt, werden „Howship Lakunen“ genannt. Nach erfolgter Resorption werden OB aktiv, füllen die entstandenen Vertiefungen mit Knochenmatrix, die hauptsächlich aus Typ-I-Kollagen , Osteocalzin und Osteopontin besteht und vervollständigen damit das „Bone Remodelling“ (Imai, et al. 2013).

1.3 Signalwege bei der Knochenumbildung

Für die Regulation des Knochenumbaus sind Interaktionen zwischen Knochenzellen, systemischen Hormonen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren unerlässlich. Der genaue Ablauf der Signaltransduktion konnte aufgrund der hohen Komplexität noch nicht vollständig geklärt werden (Nakahama 2010). Auf die wichtigsten Schritte wird im folgenden Abschnitt kurz eingegangen.

1.3.1 OC-Aktivität

Die Reifung und Funktion von OC wird vor allem gesteuert durch RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand), OPG (Osteoprotegerin) und M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) (Meikle 2006). RANKL und OPG bilden dabei ein Ligand-Rezeptor System, welches direkten Einfluss auf die Differenzierung der OC nimmt. OPG konkurriert dabei mit RANKL um den membrangebundenen Rezeptor auf den OC und wirkt somit als Inhibitor der Osteoklastogenese. M-CSF nimmt direkt Einfluss auf die OC-Präkursoren und stimuliert deren Proliferation sowie Differenzierung (Meikle 2006).

1.3.2 OB-Aktivität

Die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu OB wird vor allem durch BMP (Bone Morphogenetic Protein) und TGF-β (Tissue Growth Factor) angeregt (Imai, et al. 2013). Die Aktivität reifer OB wird stimuliert durch 1,25-$(OH)_2$-Vitamin D_3, PTH (Parathyroidhormon) und IL-1 (Interleukin). Im aktiven Zustand produzieren OB M-CSF, RANKL und OPG, wodurch die Differenzierung der OC eingeleitet wird (Meikle 2006). Somit sind Stimulatoren der OB auch indirekt für gesteigerte OC-Aktivität verantwortlich (Nakahama 2010). Zudem produzieren reife OB auch Osteocalzin, Osteopontin und Typ-1-Kollagen, welche für die Rekrutierung der OC bei der Resorption verantwortlich sind. Beim Knochenabbau, wird immer eine größere Menge dieser Proteine freigelegt und es kommt zu einer massiven Verstärkung des Rekrutierungssignals an OC (Imai, et al. 2013). Die Anregung der Resorption während des Knochenabbaus ist zur Erhaltung der Homöostase im Knochen unerlässlich (Nakahama 2010).

1.3.3 Osteozytenaktivität

Osteozyten sind synthetisch und mitotisch inaktiv, haben aber eine äußerst wichtige Funktion in der Regulation der Knochenumbildung sowie bei der endokrinen Regulation des Phosphatmetabolismus über den FGF23 (Fibroblast Growth Factor). Osteozyten können zudem RANKL exprimieren, wodurch Osteoklastogenese und Knochenabbau gesteigert werden. Über Sclerostin können Osteozyten aber auch Einfluss auf die Knochenbildung nehmen (Imai, et al. 2013).

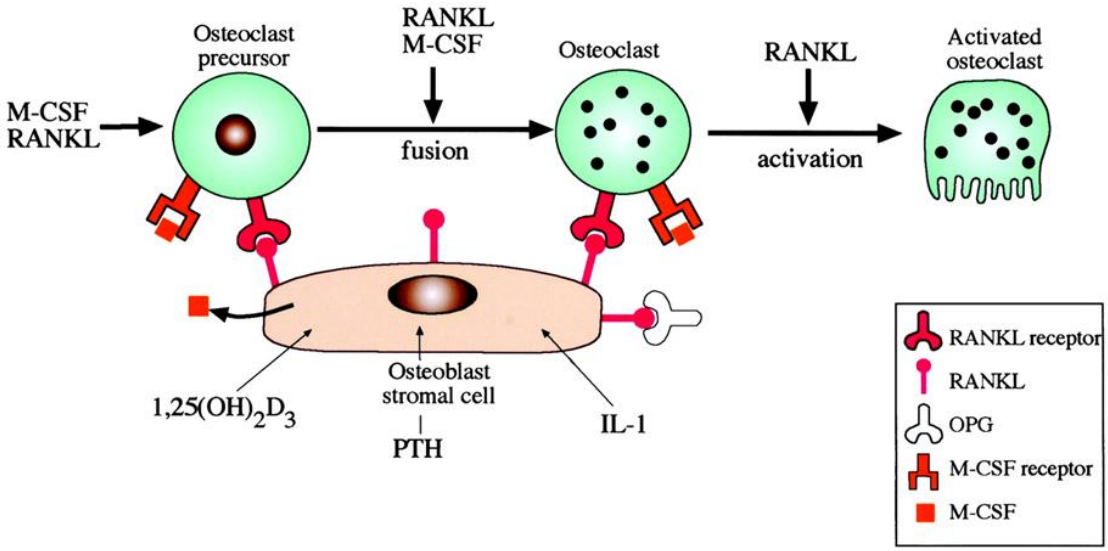

Abb. 2: Signalwege bei der Reifung der OC (Meikle 2006).

1.4 „Bone Tissue Engineering“

1.4.1 Biomedizinische Relevanz des „Bone Tissue Engineering“

Sind die Regulationsmechanismen im Knochen gestört, können Krankheiten wie Osteoporose oder Osteopetrose die Folge sein. Derzeit gewinnt in der Medizin die Versorgung von Knochenschäden in Folge von Frakturen oder Traumata durch chirurgische Eingriffe (Tumorresektion, orthopädische Chirurgie) immer mehr an Bedeutung. Ab einem bestimmten Ausmaß der Schädigung („critical size defect“) heilt der Knochen nicht mehr von alleine und muss durch Knochenersatzmaterial aufgefüllt werden (Wang, et al. 2013). Goldstandard in der Therapie solcher Verletzungen ist nach wie vor die Autotransplantation von Knochengewebe, bei der körpereigenes Material entnommen und an einer anderen Stelle dem Patienten wieder eingesetzt wird. Diese Methode hat den Vorteil, dass es kaum zu Abstoßungsreaktionen kommt, ist aber durch schlechte Verfügbarkeit des Materials stark limitiert. Als Alternative finden sich Allotransplantate, die von einem anderen Individuum gleicher Spezies stammen oder Xenotransplantate, bei denen das Material einer anderen Spezies als Knochenersatz eingesetzt wird. Da hier das Risiko für Krankheitsübertragung und Abstoßungsreaktionen gegeben ist, wird versucht, diese Methoden zu umgehen (Albrektsson and Johansson 2001).

1.4.2 Künstliches Knochenmaterial

Das Gebiet des „Bone Tissue Engineering“ versucht, Knochengewebe künstlich herzustellen, welches für *in-vitro* Testsysteme und als Implantat eingesetzt wird (Yu, et al. 2015). Um die Osseointegration zu begünstigen, werden biomimetische Materialien als Knochentransplantate verwendet, die mit biologischen Funktionen ausgestattet sind. Unter Osseointegration wird die strukturelle und funktionelle Einbindung des Transplantates in vorhandenes Knochenmaterial verstanden. Für die Eignung eines Biomaterials als Knochentransplantat sollten drei wichtige Eigenschaften erfüllt sein (Shrivats, et al. 2014):

- *Osteogenität*: die Bildung von Knochensubstanz.
- *Osteoinduktivität*: die Stimulation von Osteoprogenitorzellen zu OB, wodurch die Knochenbildung eingeleitet wird.
- *Osteokonduktivität*: die Begünstigung des natürlichen Knochenwachstums durch Gerüstfunktion eines Materials.

Für das “Bone Tissue Engineering” sollten Materialien eingesetzt werden, welche bioresorbierbar, biokompatibel sowie nicht toxisch sind und zudem das Einwachsen von Knochensubstanz zulassen (Wiedmann-Al-Ahmad, et al. 2002). Das Biomaterial muss eine der natürlichen Knochenmatrix möglichst ähnliche Struktur besitzen (Xiao, et al. 2011). Da herausgefunden wurde, dass die extrazelluläre Matrix nicht nur eine mechanische Stützfunktion besitzt, sondern wesentlich an der Kommunikation und Organisation der Zellen untereinander beteiligt ist (Kang, et al. 2014), (Sun, et al. 2006), ist es wichtig, die Einflüsse des Biomaterials auf das Zellwachstum zu charakterisieren. Erfolg im Ersatz von Knochengewebe kann nur durch Bildung von mechanisch stabilen und starken Verbindungen von Biomaterial und Knochengewebe erzielt werden (Sun, et al. 2006). Derzeit wird vor allem an der Regenerierung von Gewebe mit Gerüstsubstanzen („scaffolds“), in denen lebende Zellen verkapselt sind, in Kombination mit Wachstumsfaktoren geforscht (Xiao, et al. 2011). Die eingesetzten Biomaterialien sollen die extrazelluläre Matrix ersetzen, weshalb die mechanischen Eigenschaften dem natürlichen Vorbild angeglichen werden (Xiao, et al. 2011).

1.4.3 Biomaterialien

Ein Biomaterial stellt eine Substanz oder Kombination aus Substanzen dar, welche synthetischen oder natürlichen Ursprungs sein können und für jede gewünschte Zeitdauer eingesetzt werden können, um entweder als Ganzes oder als Teil eines Systems Gewebe, Organe oder Funktionen des Körpers zu behandeln, zu verbessern oder zu ersetzen (Helmus, et al. 2008). Um dies erfüllen zu können, müssen Biomaterialien biokompatibel sein und sollen nicht zu toxischen Effekten oder Abwehrreaktionen führen. Biokompatibilität ist die Fähigkeit eines Materials, in einer spezifischen Anwendung im Wirten eine angemessenen Reaktion hervorzurufen (Ratner 1996), (Williams 1976). Bei der Forschung an Biomaterialien stellen sowohl deren Synthese, Optimierung, physikalische und biologische Charakterisierung als auch die Analyse von Wechselwirkungen zwischen Wirt und Material zentrale Themen dar (Yu, et al. 2015). Als eine für das „Bone Tissue Engineering“ besonders wichtige und häufig eingesetzte Substanzklasse haben sich Hydrogele erwiesen (Xiao, et al. 2011).

1.5 Hydrogele

Hydrogele sind dreidimensionale, hydrophile Strukturen aus vernetzten Polymeren, die in der Lage sind, große Mengen an Wasser oder biologischen Flüssigkeiten aufzunehmen. Es kann ein Gleichgewichtszustand eintreten, wenn der Anteil an Wassermolekülen innerhalb und außerhalb des Hydrogels gleich groß ist. Wieviel Wasser gebunden werden kann, hängt mit der Dichte der Vernetzung zusammen (Drumheller and Hubbell 1995), (Nichol, et al. 2010).

1.5.1 Hydrogele für das „Bone Tissue Engineering“

Hydrogele werden im Bereich des „Bone Tissue Engineering“ sehr häufig als künstliches Knochengewebe eingesetzt, mit der Besonderheit, dass sie sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro* verhärtet werden können (Ifkovits and Burdick 2007). Die Methode des „Bioprinting“ ist dafür eine neue, vielversprechende Technik. Dabei ist die erforderliche Biotinte nicht selten auf Hydrogelbasis (Das, et al. 2015). Auch in der Entwicklung von Systemen zur gezielten Wirkstoff-Freisetzung oder von modifizierten Oberflächen zur kontrollierten Zellanhaftung an das Material bieten sie eine Vielfalt an Möglichkeiten (Ferreira, et al. 2008), (Ranjha 1999). Gründe für den häufigen Einsatz von Hydrogelen im „Bone Tissue Engineering“ sind die strukturelle Ähnlichkeit zur natürlichen extrazellulären Matrix, der hohe Wassergehalt, hohe Biokompatibilität und günstige Diffusionsbedingungen für Sauerstoff, Nähr- oder Abfallstoffe (Xiao, et al. 2011).

Biomedizinisch eingesetzte Hydrogele werden unterschieden in natürliche und synthetische Polymere (Bose and Bandyopadhyay 2013). Zur Gruppe der natürlichen Polymere werden unter anderem Kollagen, Gelatine, Fibrin, Alginate, Chitosan und Chitin sowie Hyaluronsäure gezählt. Beim Einsatz synthetischer Vertreter wie Acryle, Polyamide, Polyester, Polyethylene, Polysiloxane oder Polyurethane treten im Vergleich häufiger Entzündungsreaktionen auf. Die natürlichen Vertreter sind vor allem wegen der höheren Biokompatibilität den synthetischen Hydrogelen überlegen (Brodbeck, et al. 2001).

1.5.2 Hybrid-Hydrogele

Die Kombination von unterschiedlichen Komponenten in einem zusammengesetzten Biomaterialsystem (Hybrid-Hydrogel) ist für das „Bone Tissue Engineering“ besonders geeignet, da die mechanischen und funktionellen Eigenschaften an die vom Empfängergewebe gegebenen Anforderungen angepasst werden können und die Gewebebildung angeregt werden kann (Xiao, et al. 2011). Durch die Auswahl der jeweiligen Materialien und der Dichte der Vernetzungen („Crosslinks“) können physikalische, chemische und biologische Eigenschaften des Hydrogels gezielt verändert werden (Xiao, et al. 2011). Um die unterschiedlichen Komponenten zu einem Hybrid-Hydrogel zu verknüpfen, sind physikalische oder chemische Wechselwirkungen nötig, die reversibel oder irreversibel sein können. Reversible Vernetzung findet auf physikalischem Weg statt und kommt durch ionische Kräfte, Wasserstoffbrücken oder hydrophobe Effekte zustande (Campoccia, et al. 1998). Die chemische Vernetzung erfolgt hingegen kovalent, weshalb sie permanent ist und eine höhere mechanische Stabilität aufweist. Dazu ist eine Nachhärtung der Polymere erforderlich, wozu vor allem die radikalische Polymerisation angewendet wird (Ferreira, et al. 2008).

1.5.3 Radikalische Polymerisation, Photopolymerisation

Zur irreversiblen Vernetzung eines Polymers werden die Monomere kovalent verbunden (chemisch), was durch Zufuhr physikalischer Energie in Form von Wärme oder Licht (sichtbar oder UV) ausgelöst wird. Die Photopolymerisation ist dabei der thermischen Methode durch schnelle Reaktionszeiten sowie niedrigem Energie- und Kostenaufwand überlegen (Ferreira, et al. 2008). Für diese Methode ist der Einsatz eines Photoinitiators (PI) erforderlich, die Licht bei der Wellenlänge der Anregungsstrahlung absorbieren und dabei aktiviert werden, indem sie chemisch in reaktive Spezies gespalten werden. Je nach Art des PI entstehen radikalische oder seltener kationische reaktive Spezien, die mit ungesättigten Gruppen an den Monomeren reagieren. Diese werden dadurch selbst in reaktive Spezies gespalten und können beim Aufeinandertreffen zweier Monomerradikale untereinander chemisch verknüpft werden, wodurch sich rasch eine Polymermatrix ausbildet. Besonders auf dem Gebiet des „Bone Tissue Engineering“ spielen photopolymerisierbare Hydrogele eine zentrale Rolle (Ferreira, et al. 2008).

1.6 Biopolymer Gelatine

Das Biopolymer Gelatine ist ein Produkt der partiellen Hydrolyse von Kollagen, welches der wichtigste Proteinvertreter in tierischer Haut, Bindegewebe, Knorpel und Knochen ist. Die Extraktion kann auf saure oder alkalische Weise ablaufen, wobei das Kollagen in seine Tropokollagen-Untereinheiten zerlegt wird, die im Kollagen in einer Trippelhelix angeordnet sind (Djabourov, et al. 1993). Je nach Extraktionsart werden zwei Gelatinetypen unterscheiden. Gelatine A mit einem isoelektrischen Punkt von 9,0 wird durch das saure Aufschlussverfahren erhalten. Unter physiologischen Bedingungen wird es protoniert. Hingegen liegt das Produkt der alkalischen Hydrolyse, Gelatine B, mit einem isoelektrischen Punkt von 5,0 in physiologischer Umgebung negativ geladen vor. Das unterschiedliche Dissoziationsverhalten kann zur Steuerung der Wirkstofffreisetzung in Therapeutika genutzt werden (Yamamoto, et al. 2001). Wässrige Gelatinelösungen gehen ab einer Temperatur von 37°C in die Sol Phase über, in der die Tropokollagen-Ketten einzeln und frei beweglich vorliegen und kolloidal gelöst sind. Eine wichtige Eigenschaft dieser Lösung ist, dass bei einer ausreichend hohen Gelatinekonzentration (ca. 1 %) beim Abkühlen ein transparentes Gel entsteht, das durch eine weitreichende Quervernetzung der Einzelketten zustande kommt (Djabourov, et al. 1993).

Die Einsatzgebiete von Gelatine reichen von der Lebensmittelindustrie, Pharmazie und Photographie bis hin zur Technologie. Wichtig ist der medizinische Einsatz der Gelatine als Biomaterial im Bereich des „Bone Tissue Engineering“, da sie sich durch Bioabbaubarkeit, Biokompatibilität, geringe Antigenität und relativ geringe Kosten auszeichnet. Die gute Wasserlöslichkeit limitiert den Einsatz von Gelatine als Biomaterial, kann aber durch irreversible Polymerisation umgangen werden. Für die Vernetzung der Gelatine können physikalische Methoden, wie Strahlung oder Wärme oder aber chemische Reagenzien, wie Glutaraldehyd, Formaldehyd, Carbodiimide oder Genipin eigesetzt werden (Farris, et al. 2010).

Eine sehr interessante Entwicklung zur Herstellung von Biomaterialien auf Gelatinebasis ist die Modifikation des Moleküls mit photopolymerisierbaren funktionellen Gruppen mit beispielsweise Acrylaten oder Methacrylaten. Auf diese Weise werden die unterschiedlichen Methoden und Ansätze kombiniert, um ein optimales Knochenersatzmaterial zu finden (Chen, et al. 2011).

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Die Synthese von methacrylierter Gelatine B (GelMA), sowie deren Photopolymerisation mit dem Photoinitiator (PI) Irgacure 2959 waren Hauptbestandteil des ersten Teils der praktischen Arbeit. Ziel war es, ein Hydrogel herzustellen, welches als Anhaftungsfläche zur Kultivierung primärer Maus-Osteoblasten (OB) geeignet war. Zunächst erfolgte die Bestimmung der Ausbeute an Syntheseprodukt und durch ^{1}H-NMR-Spektroskopie wurde das Vorliegen der gewünschten Struktur überprüft. Zur Charakterisierung des Syntheseprodukts wurde das Ausmaß der Substitution von freien Aminogruppen mit Methacryl-Gruppen über den Substitutionsgrad ermittelt, für dessen Bestimmung die Interpretation der ^{1}H-NMR-Spektren und der Habeeb-Test eingesetzt wurden.

Im weiteren Verlauf wurde eine geeignete Methode für die Photopolymerisation der 10 % GelMA-Lösungen entwickelt, indem die Konzentrationen des PI sowie die UV-Bestrahlungsdauer angepasst wurden. Mechanische Eigenschaften des polymerisierten Hydrogels wurden über die Gelfraktion und den Quellungsfaktor aufgezeigt.

Ob die einzelnen Komponenten des Hydrogels einen Einfluss auf die Zellviabilität primärer OB ausüben, wurde in einer gesonderten Versuchsreihe untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Hydrogele *in-vitro* an primären OB getestet. Dazu wurden die Photopolymerisationstechnik, die Methode der Zellaussaat und die Vorbehandlung der Hydrogele soweit optimiert, dass es möglich war, vergleichbare Bedingungen für weitere Experimente zu schaffen. Nach der Optimierungsphase wurden schlussendlich Einflüsse dieses GelMA-Hydrogels auf Zellfunktion und Differenzierung primärer OB *in-vitro* bestimmt.

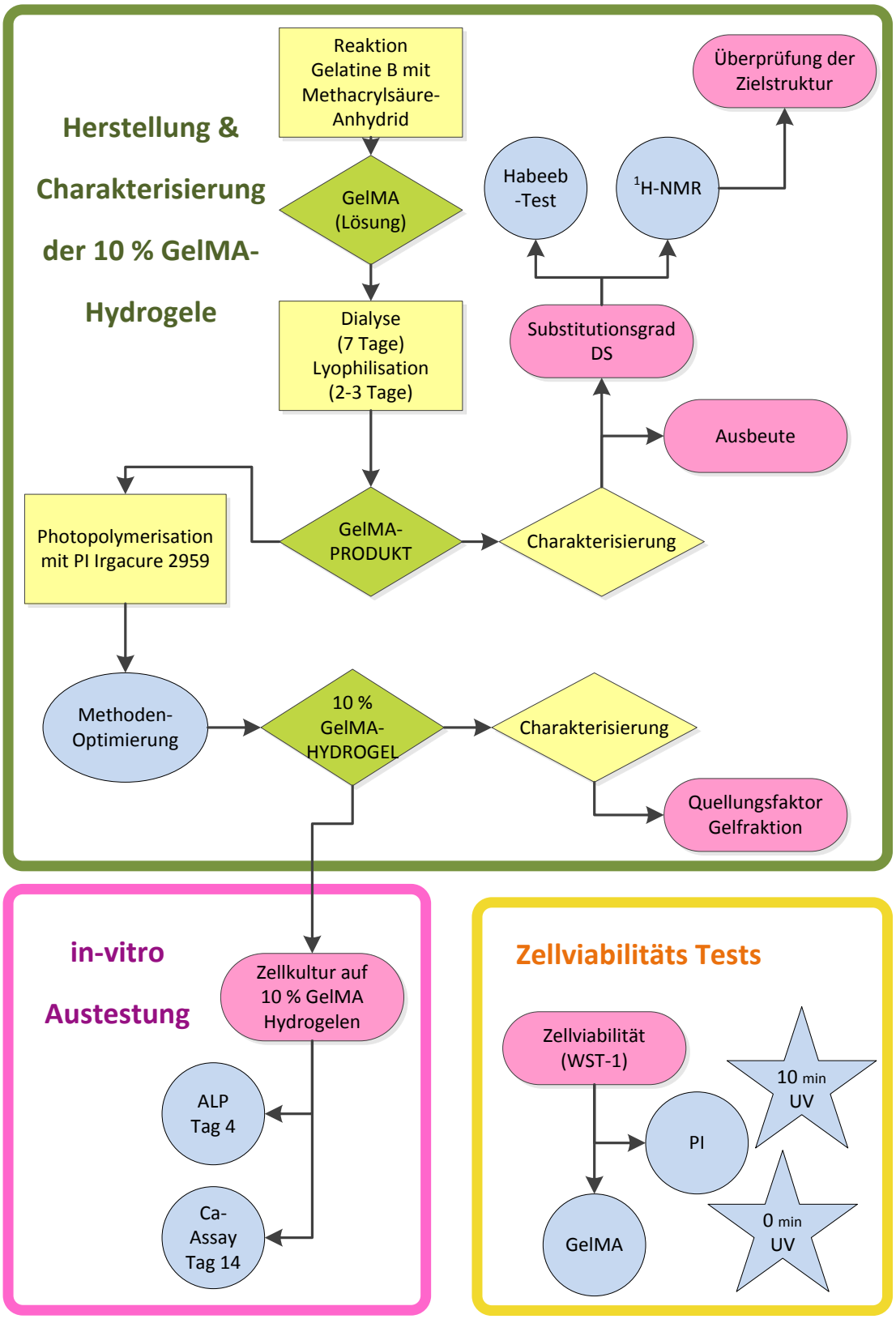

Abb. 3: Schematischer Versuchsaufbau der praktischen Arbeit.

2.2 Methacrylierte Gelatine B (GelMA)

2.2.1 Synthese der GelMA

Für die Photopolymerisation von Gelatine B wurden ε-Aminofunktionen, die ausschließlich in den Seitenketten der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Ornithin vorkommen, mit Methacryl-Gruppen substituiert, um polymerisationsaktive Funktionen am Molekül einzubringen (Van Den Bulcke, et al. 2000), (Nichol, et al. 2010), (Mironi-Harpaz, et al. 2012), (Jung and Oh 2014).

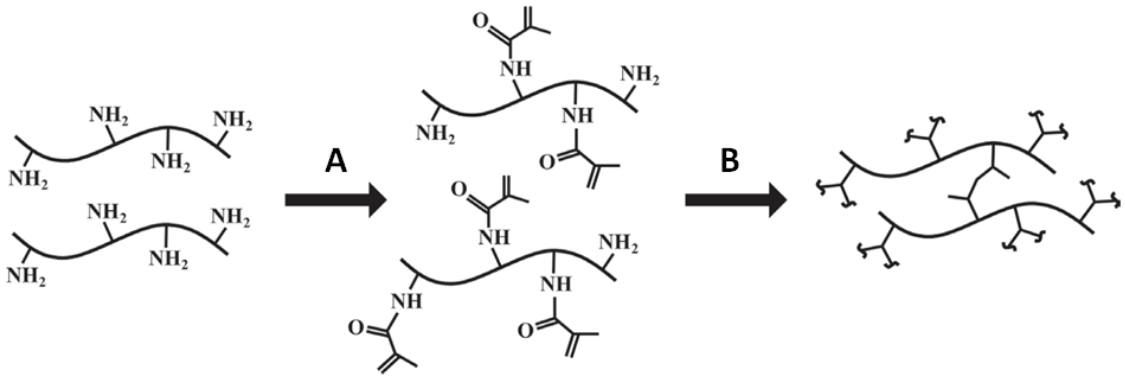

Abb. 4: Reaktionsschema bei der Hydrogelherstellung: Im ersten Schritt (A) wurde durch Zusatz von Methacrylsäureanhydrid die Gelatine B durch Einbringung von Methacryl-Gruppen modifiziert, um diese im zweiten Schritt (B) unter Einsatz des PI Irgacure 2959 und UV-Anregung polymerisieren zu können (Jung and Oh 2014).

2.2.2 Durchführung der Substitution von Gelatine B mit Methacryl-Gruppen

Gelatine B wurde in einer Konzentration von 10 % bei 40°C unter ständigem Rühren in PBS (Phosphatpuffer pH 7,4) gelöst. Pro Gramm Gelatine wurden 0,5 ml Methacrylsäureanhydrid mit einer Flussrate von 0,5 ml/min unter starkem Rühren zugesetzt. Für die Reaktion wurde die Mischung in einem verschlossenen Erlenmeyer-Kolben für eine Stunde bei einer Temperatur von 50°C stark durchmischt. Eine 1:5 Verdünnung mit 37°C warmem PBS beendete die Synthese. Um die bei der Synthese angefallene Methacrylsäure zu entfernen, wurde die Lösung für 7 Tage bei 40°C gegen bidestilliertes Wasser dialysiert. Es wurden Spectra/Por® 4 Dialysenmembranen (Molekülgrößen: 12,0-14,0 kDa) eingesetzt. Das Endprodukt, GelMA, erhielt man nach 72 h Lyophilisation und wurde bei -80°C gelagert.

2.2.3 Charakterisierung von GelMA

2.2.3.1 Bestimmung der Ausbeute

Die Ausbeute an Syntheseprodukt wurde auf der Analysenwaage bestimmt und auf 1 g eingesetzte Gelatine B bezogen.

2.2.3.2 Quantitative ^{1}H-NMR-Spektroskopie zur Strukturanalyse

Die ^{1}H-NMR-Spektroskopie ist eine Standardmethode in der Strukturaufklärung organischer Verbindungen. Ihr Prinzip beruht auf der Messung unterschiedlicher Elektronendichten, welche über Kernspin-Resonanz erfolgt. Mit der ^{1}H-NMR-Spektroskopie ist es anhand spezifischer Signale im Spektrum möglich, die eingeführten funktionellen Gruppen am Molekül nachzuweisen.
Die ^{1}H-NMR-Spektren wurden auf einem hochauflösenden Bruker Avance 500 NMR-Spektrometer (UltraShield) mit einer Resonanzfrequenz von 550,13 MHz aufgenommen. Zur Vermessung wurden 5 mg der Gelatine B oder GelMA in 0,7 ml Deuteriumoxid (D_2O) gelöst. Die chemischen Verschiebungen wurden anhand des Signals von nicht-deuteriertem Lösungsmittel (Wasser ^{1}H δ 4,72 ppm) als interner Standard ermittelt, wonach die Signalzuordnung im Spektrum erfolgen konnte (Tabelle 1).

Chemische Verschiebung	**Funktionelle Gruppe des H-Atoms**	**Abkürzung in der Formel**
~0,8 ppm	(Alkyl-) Methyl (6H-Atome)	G
4,72 ppm	Wasser, interner Standard	-
~ 5,3 ppm	Methacryl (I)	MA1
~ 5,5 ppm	Methacryl (II)	MA2

Tabelle 1: Übersicht über die Signale und deren Zuordnung im ^{1}H-NMR-Spektrum.

Für eine Quantifizierung der enthaltenen funktionellen Gruppen konnten die Peakflächen der Methacryl-H-Atome mit Signalen von H-Atomen, deren Konzentration bekannt ist, verglichen werden. Hierzu wurden die Peakflächen von H-Atomen der aliphatischen Methylgruppen herangezogen, die bei einer chemischen Verschiebung von etwa 0,8 ppm lagen. Diese funktionelle Gruppe war in den Aminosäuren Valin (0,230 mmol/g), Leucin (0,260 mmol/g) und Isoleucin (0,150 mmol/g) enthalten und inert gegenüber der Methacrylierungsreaktion, weshalb dieses Signal immer die Menge der unsubstituierten Grundstruktur (Gelatine B) repräsentierte. Die Peakfläche kam durch Überlagerung von 6

gleichwertigen H-Atomen aus zwei endständigen Methylgruppen zustande und entsprach einer Konzentration von 0,640 mmol/g Gelatine B, welche durch Summierung der Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren ermittelt wurde. Die Bedeutung der Abkürzungen in den Formeln für die Berechnungen können der als Legende erstellten Tabelle 2 entnommen werden.

Abkürzung	Bedeutung in der Formel
G	… Signal der Gelatine B-Referenz bei 0,8 ppm mit der bekannten Stoffmengenkonzentration von 0,640 mmol/g Gelatine B
MA1	… Signal des ersten Methacryl-H bei 5,3 ppm
MA2	… Signal des zweiten Methacryl-H bei 5,5 ppm
$n(\varepsilon NH_2)$	… Stoffmenge der freien ε-Aminogruppen
n(NHma)	… Stoffmenge der enthaltenen modifizierten Aminogruppen
n1	… Stoffmenge der enthaltenen modifizierten Aminogruppen anhand des Integrals des ersten Methacryl-Signals bei 5,3 ppm (MA1)
n2	… Stoffmenge der enthaltenen modifizierten Aminogruppen anhand des Integrals des zweiten Methacryl-Signals bei 5,5 ppm (MA2)

Tabelle 2: Legende für die Formeln zur quantitativen ^{1}H-NMR-Spektroskopie.

Zur Methacrylierung waren endständige Aminogruppen erforderlich, welche in Aminosäuren-Seitenketten von Lysin (0,280 mmol/g), Hydroxylysin (0,070 mmol/g) und Ornithin (0,035 mmol/g) vorlagen und in Summe in einer Konzentration von 0,385 mmol/g Gelatine B enthalten waren, was einer Substitutionseffizienz von 100 % entsprach.

$$n(\varepsilon NH_2) = \int G$$

Pro eingeführtem H-Atom wurde ein neues Signal im ^{1}H-NMR-Spektrum sichtbar. Aufgrund von Kopplungseffekten kam es bei den beiden H-Atomen der Methacryl-Funktion zu einer Abweichung der chemischen Verschiebung. Der erste Methacryl-Peak erschien bei etwa 5,3 ppm während der zweite um 5,5 ppm lag. Jedes dieser Signale repräsentierte ein H-Atom.

Für die Quantifizierung wurde nun eine Proportionalitäts-Konstante (k) eingeführt, um die Integrale in Relation bringen zu können. Diese wurde anhand des Integrals der 6 Methyl-H-Atome ermittelt, welche einer Konzentration von 0,640 mmol/g Gelatine entsprach.

$$\int G = 6 \times k \times 0{,}640 \text{ mmol/g}$$

$$\rightarrow k = \int G / 3{,}84$$

Der ermittelte Wert für k wurde in der Berechnung der Konzentration der Methacryl-H-Atome, die für beide einzeln ermittelt wurde, weiterverwendet. Die Stoffmenge wurde daraufhin als Mittelwert der beiden Einzelwerte ausgedrückt.

$$\int MA1 \text{ oder } \int MA2 = 1 \times k \times n(\varepsilon NH_2)$$

$$\rightarrow n1 = \int MA1 / k = \int MA1 / (\int G / 3{,}84)$$
$$\rightarrow n2 = \int MA2 / k = \int MA2 / (\int G / 3{,}84)$$

$$n(NHma) = (n1-n2) / 2$$

2.2.3.3 Ermittlung des Substitutionsgrades (DS)

Einen wichtigen Parameter zur Charakterisierung der GelMA stellt der Substitutionsgrad (Degree of Substitution, DS) dar. Er beschreibt prozentuell die Menge der enthaltenen methacrylierten ε-Aminogruppen und dient im weiteren Verlauf der Berechnung der benötigten Menge an PI oder zur Abschätzung mechanischer Eigenschaften (Van Den Bulcke, et al. 2000).

2.2.3.3.1 Methode 1: ^{1}H-NMR-Spektroskopie

Für die Berechnung des DS wurden die Ergebnisse der quantitativen ^{1}H-NMR-Spektroskopie weiterverwendet. Der DS errechnet sich anhand nachfolgender Formel (Abkürzungen siehe Tabelle 2) aus dem Verhältnis der Stoffmengen an methacrylierten Aminogruppen zu der Stoffmenge an freien Aminogruppen (Jung and Oh 2014), (Ovsianikov, et al.).

$$DS = (n(HNma) / n(\varepsilon NH_2)) * 100$$

2.2.3.3.2 Methode 2: Habeeb-Test

Freie Aminogruppen reagieren mit 2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS) zu einem gefärbten Produkt, welches ein Absorptionsmaximum bei 335 nm besitzt und vermessen werden kann (Habeeb 1966). Im Vergleich zur GelMA besitzt unmodifizierte Gelatine B einen höheren Anteil an freien ε-Aminogruppen, welche zur Bildung des Farbstoffes herangezogen werden konnten, woraus man den Substitutionsgrad (DS) berechnen konnte (Jung and Oh 2014).

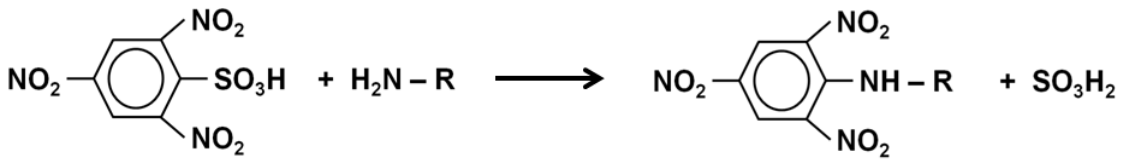

Abb. 5: Reaktionsschema der Farbstoffbildung beim Habeeb-Test: Das entstandene Produkt ist orange gefärbt und kann bei einer Wellenlänge von 335 nm spektrophotometrisch vermessen werden.

2.2.3.4 Durchführung des Habeeb-Tests

Zur Vermessung wurden 1,25 % wässrige Lösungen von GelMA und unmodifizierter Gelatine B hergestellt. Als Negativkontrolle diente MilliQ Wasser. Eine Mischung aus Prüflösung, Phosphatpuffer pH 8,5 und 0,1 % TNBS-Lösung (je 250 µl) wurde auf einer 24-Well-Gewebekulturplatte in Triplikaten vorbereitet und vermessen. Die Reaktion erfolgte bei 40°C für 4 h im Schüttelinkubator. Um die Färbung zu stabilisieren wurden pro Well 250 µl 10 % Natriumdodecylsulfat-Lösung (Sodiumdodeclysulfate, SDS) zugesetzt und 15 min bei 40°C inkubiert. Unmittelbar nach Zusatz von 125 µl 1N HCl wurde die Absorption bei 335 nm vermessen und anschließend der DS berechnet.

2.2.3.5 Berechnung des DS mittels Habeeb-Test

Der DS wurde anhand der gemessenen Absorptionswerte berechnet, von denen der Absorptionsmittelwert der Negativkontrolle (N) subtrahiert wurde. Der Substitutionsgrad wurde prozentuell als Verhältnis der Absorptionswerte der GelMA-Probe (GelMA) zu unmodifizierter Gelatine B (GelB) ausgedrückt, wozu nachfolgende Formel zur Anwendung kam. Die Ergebnisse wurden auf Übereinstimmung mit der ^{1}H-NMR-Analyse überprüft.

$$DS\ (\%) = (1 - ((GelMA - N) / (GelB - N))) * 100$$

2.3 Hydrogelherstellung durch UV-Photopolymerisation

UV-Photopolymerisation beschreibt die chemische Vernetzung von Monomeren zu einer Polymermatrix, welche durch Zufuhr von Energie in Form von UV-Licht ausgelöst wurde. Für die polymerisierbar gemachte GelMA wurde Irgacure 2959 (1-[4-(2-Hydroxyethoxy)-phenyl]-2-hydroxy-2-methyl-1-propan-1-on) als PI eingesetzt.

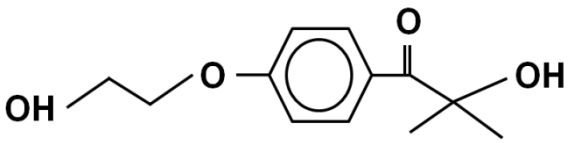

Abb. 6: Chemische Struktur des PI Irgacure 2959.

2.3.1 Berechnung der PI-Konzentration

Je nach Konzentration des PI wurden unterschiedlich feste Hydrogele hergestellt. Es wurden Irgacure 2959 Lösungen in 10, 15, 30 und 100 mol% bezogen auf die modifizierten ε-Aminogruppen (DS * 0,385 mmol/g GelMA) hergestellt. Der DS wurde für die Berechnung auf 70 % festgelegt, da er bei allen Syntheseprodukten etwa in dieser Größenordnung lag. Über das Molekulargewicht von Irgacure 2959 von 224,25 g/Mol wurde die entsprechende Menge an PI in der Lösung ermittelt.

mol%	mg/ml
10 mol%	0,6 mg/ml
15 mol%	1 mg/ml
30 mol%	2 mg/ml
100 mol%	6 mg/ml

Tabelle 3: Eingesetzte Konzentrationen an Irgacure 2959 für die Herstellung von 10 % GelMA-Lösungen.

2.3.2 Herstellung der PI-Lösungen

Eine 6 mg/ml PI-Lösung wurde hergestellt, indem die entsprechende Menge Irgacure 2959 (MW=224,25 g/Mol) für 10 min am Ultraschallbad vollständig in MilliQ Wasser gelöst wurde. Diese Lösung wurde mit MilliQ Wasser auf 2 sowie 1 und 0,6 mg/ml verdünnt. Die Lösungen konnten unter Lichtschutz bis zu einem Monat lang aufbewahrt werden.

2.3.3 Herstellung der 10 % GelMA-Lösungen

Für die Herstellung der Hydrogele wurde eine 10 % GelMA-Lösung verwendet. Die benötigte Menge an lyophilisierter GelMA wurde in der jeweiligen PI-Lösung am Magnetrührer bei 50°C für 10 min gelöst. Um eine vorzeitige Reaktion des PI zu unterbinden, wurde unter Lichtschutz gearbeitet.

2.3.4 Strategien zur Herstellung runder Hydrogele

Für die Photopolymerisation wurden drei unterschiedliche Methoden zur Formgebung angewendet, die in Tabelle 4 mit den entsprechenden Volumina an 10 % GelMA-Lösung angeführt werden.

Beschichtungsart	**Volumen 10 % GelMA-Lösung**
Deckglasbeschichtung	25 µl
Direktbeschichtung der Wells	100 µl
Gießformen	1500 µl

Tabelle 4: Übersicht über eingesetzte Volumina an 10 % GelMA-Lösung für die unterschiedlichen Beschichtungsarten.

2.3.4.1 Deckglasbeschichtung

Ein Teflonspacer wurde mit ungespanntem Parafilm bedeckt. 25 µl 10 % GelMA-Lösung wurden als Tropfen auf den Parafilm aufgebracht und mit einem Deckglas (12 mm) oder einem Gewebekultur-Deckglas (Thermanox®, NUNC™, 13 mm) abgedeckt. Nach der Photopolymerisation konnte das Plättchen samt Hydrogel leicht vom Parafilm abgezogen und ein dünner Gelatinefilm gewonnen werden.

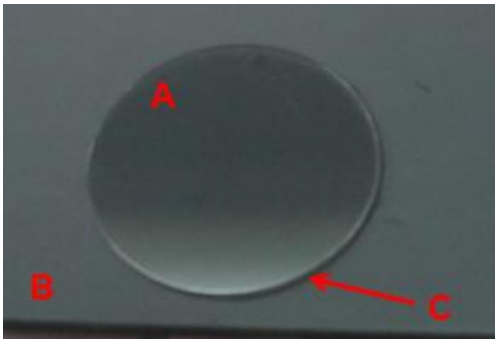

Abb. 7: Deckglasbeschichtung: Mit einem Gewebekultur-Deckglas (A) wurde auf einem mit Parafilm bespannten Teflon-Spacer (B) ein 25 µl-Tropfen einer 10 % GelMA-Lösung bedeckt, der als Film (C) zwischen den beiden Oberflächen lag.

2.3.4.2 Hydrogelherstellung in Gießformen

Die Gießformen bestanden aus zwei Objektträgern, welche durch zurechtgeschnittene Silikonspacer voneinander getrennt gehalten wurden. Fixiert wurde das Konstrukt durch Papierklemmen. Nach erfolgter Photopolymerisation konnten aus dem Hydrogelfilm runde Plättchen (Ø=7 mm, h=1 mm) mit Hilfe einer Stanze ausgestochen werden.

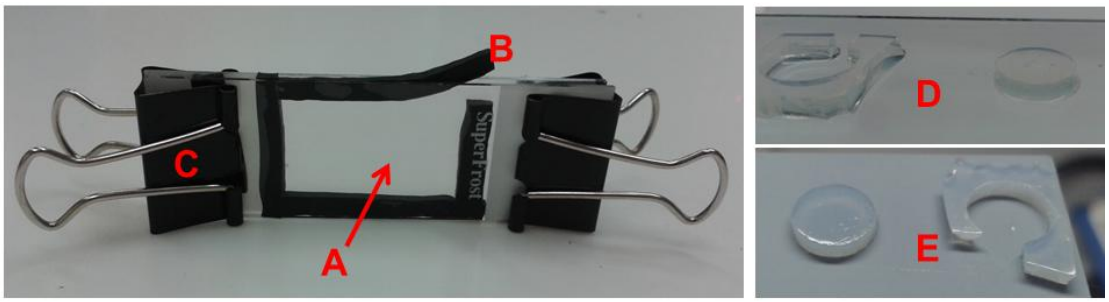

Abb. 8: Gießform zur Herstellung eines Hydrogelfilms (ca. 40x25x1 mm): Diese bestanden aus Objektträgern (A), 1 mm dicken Silikonspacern (B) und Papierklemmen (C) zur Fixierung des Konstrukts. Aus dem erhaltenen Hydrogelfilm wurden runde Plättchen (Ø=7 mm, h=1 mm) ausgestanzt (D, E), die sich als Kultivierungsfläche für primäre OB eigneten.

2.3.4.3 Direkte Wellbeschichtung

Die 10 % GelMA-Lösung konnte nach der Füllung der Wells mit UV-Licht polymerisiert werden. Dazu wurden 100 µl der Lösung auf einer 96 Well-Mikrotiterplatte eingesetzt.

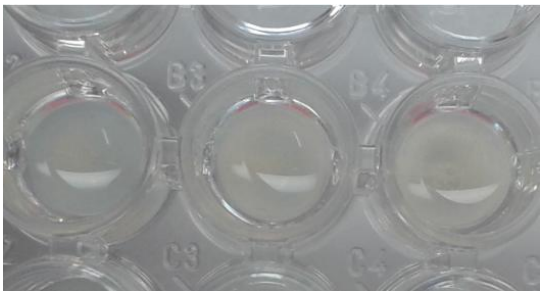

Abb. 9: Direktbeschichtung von Wells: 100 µl der 10 % GelMA-Lösung wurden pro Well eingesetzt.

2.3.5 UV-Photopolymerisation der 10 % GelMA-Lösungen zu Hydrogelen

Unabhängig von der Herstellungsart wurden die 10 % GelMA-Lösungen für 15 min mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm bei einer Strahlungsintensität von 4 mW/cm^2 photopolymerisiert. Dafür wurde ein UV-Crosslinker (CL-1000L) der Firma LTF Labortechnik eingesetzt.

2.3.6 Vorbereitung der Hydrogele für zelluläre Experimente

2.3.6.1 Sterilisierung der Hydrogele

Zur Kultivierung von Zellen mussten die Hydrogele sterilisiert werden. Dazu wurden sie unter einer Sterilwerkbank (Laminar-Air-Flow, LAF) zunächst auf der Oberseite für 15 min mit UV-Licht bestrahlt. Bei den Deckglasbeschichtungen erfolgte dieser Schritt noch am Teflonspacer, bei der Gießform wurde davor noch der obere Objektträger der Form entfernt.
Die runden Hydrogele wurden nach Ablösen vom Teflonspacer beziehungsweise Ausstanzung aus dem Hydrogelfilm in Gewebekulturplatten überführt und dabei einmal gewendet, sodass auch die zweite Oberfläche für 15 min mit UV-Licht bestrahlt werden konnte. Für direkt beschichtete Wells war einmaliges Bestrahlen für 15 min auf der Oberseite ausreichend.

2.3.6.2 Vorinkubation der Hydrogelplättchen

Um die Nachquellung des Materials möglichst gering zu halten und die Umgebungsbedingungen an die im Inkubator herrschenden anzupassen, wurden die Hydrogelplättchen (Ø=7 mm, h=1 mm) für zwei Tage in 0,5 ml KM bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert, bevor die Aussaat der Zellen erfolgte. Dieser Schritt entfiel bei der Deckglasbeschichtung aufgrund der geringen Schichtdicke des Hydrogelfilms.

2.3.6.3 Überführen der runden Hydrogele in Gewebekulturplatten

Für Zellversuche wurden die hergestellten Hydrogele in die entsprechenden Kulturplatten überführt. Dabei kamen für die Deckglasbeschichtungen 24 Well-Gewebekulturplatten und für die ausgestanzten Hydrogele 48 Well-Gewebekulturplatten zum Einsatz.

2.4 Charakterisierung der Hydrogele nach erfolgter Polymerisation

Für die Charakterisierung der Hydrogele nach erfolgter Polymerisation wurden 10 % GelMA-Lösungen in einer 2 mg/ml PI-Lösung in MilliQ Wasser hergestellt. Diese wurde in 96 Well-Mikrotiterplatten direkt polymerisiert, wofür 100 µl pro Well eingesetzt wurden. Nach einer Bestrahlung von 15 min bei 4 mW/cm^2 zur Polymerisation wurden die Hydrogele auf Parafilm gelegt und getrocknet.
Das Gewicht der trockenen Probe (Gt) konnte anschließend mit dem Gewicht nach drei Tagen Quellung in PBS bei 37°C und 5 % CO_2 (Gq) verglichen und zur Berechnung der Gelfraktion (GF) sowie des Quellungsfaktors (QF) herangezogen werden. Diese zwei Parameter dienen der Charakterisierung mechanischer Eigenschaften der 10 % GelMA-Hydrogele (Lien, et al. 2008).

2.4.1 Berechnung der GF

Die GF gibt an, welchen prozentuellen Gewichtsanteil des gequollenen Hydrogels von der GelMA eingenommen werden. Sie berechnet sich nach der unten angeführten Formel anhand des Verhältnisses des Trockengewichts (Gt) zu dem Gewicht nach drei Tagen Quellung in PBS (Gq).

$$GF\ (\%) = ((Gt) / (Gq)) * 100$$

2.4.2 Berechnung des QF

Der QF gibt prozentuell an, um wieviel das Gewicht des Hydrogels während der Quellung für drei Tage in PBS angestiegen ist. Für die Berechnung kam folgende Formel zur Anwendung.

$$GF\ (\%) = ((Gq - Gt) / (Gt)) * 100$$

2.5 Zellviabilitätstest (WST-1-Assay)

Das wasserlösliche Tetrazoliumsalz WST-1 (Water Soluble Tetrazolium-1) wird an der Oberfläche lebender Zellen in ein lösliches Formazan gespalten. Anhand der Menge an gebildetem Produkt kann man auf die Viabilität der OB rückschließen, da diese von deren metabolischen Aktivität abhängt (Chatterjee, et al. 2010).

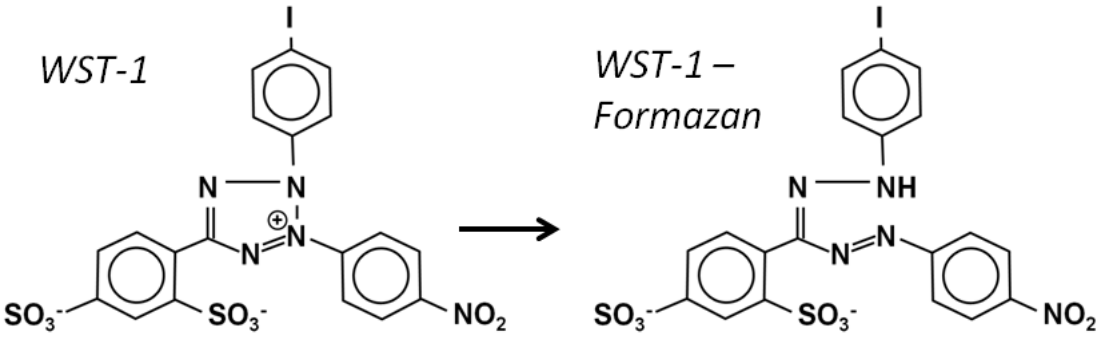

Abb. 10: Reaktionsschema beim Zellviabilitätstest: WST-1 wird dabei an der Zelloberfläche in das gefärbte WST-1-Formazan gespalten.

Es wurde in zwei unterschiedlichen Versuchen der Einfluss der einzelnen Komponenten des Hydrogels auf die Viabilität primärer OB getestet. Dafür wurde in der ersten Versuchsreihe das Zusammenwirken von PI und UV-Licht analysiert und in einer zweiten der Einfluss der GelMA auf das Zellwachstum.

2.5.1.1 Zellaussaat für den WST-1-Assay

Für die Austestung der Zellviabilität unter Einfluss der Hydrogel-Komponenten wurden primäre OB (Fraktion III und IV) eingesetzt. Diese wurden in 24 Well-Gewebekulturplatten in einer Zelldichte von $8{,}4 \times 10^4$ Zellen/cm^2 in 0,5 ml Suspension in KM ausgesät und bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert. Als KM diente 10 % α-MEM. Die Testsubstanzen wurden in jeweils vier unterschiedlichen Konzentrationen im KM gelöst.

2.5.1.2 Einfluss des PI und dessen Aktivierung mittels UV-Bestrahlung auf die Zellviabilität primärer OB via WST-1-Assay

Es wurden vier unterschiedliche Konzentrationen (0,1, 0,3, 0,6 und 1 mg/ml) des PI in KM hergestellt. Die Zellen wurden in 24 Well-Gewebekulturplatten in einer Dichte von $8{,}4 \times 10^3$ Zellen/cm^2 ausgesät und bei 37°C und 5 % CO_2 für 48 h kultiviert. Danach erfolgte die Durchführung des WST-1-Assays.

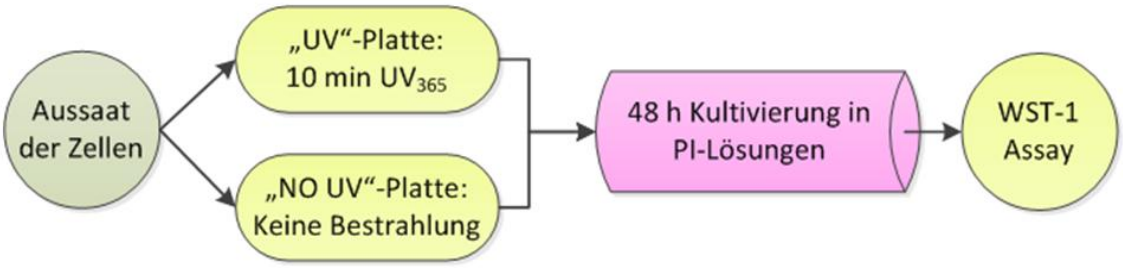

Abb. 11: Schematischer Ablauf der Kultivierung der primären OB zur Austestung des Einflusses auf die Zellviabilität durch den PI.

Um den Einfluss der Aktivierung des PI durch UV-Licht zu analysieren, wurden zwei Platten parallel angesetzt, von denen eine 10 min nach der Aussaat für weitere 10 min mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm und einer Strahlungsintensität von 4 mW/cm^2 bestrahlt wurde. Die zweite Platte wurde für diese Zeit lichtdicht abgedeckt.

2.5.1.3 Einfluss der GelMA auf die Zellviabilität primärer OB via WST-1-Assay

GelMA wurde für den WST-1-Assay in vier Konzentrationen (0,1, 0,2, 0,5, und 1 %) in KM gelöst. Die Zellaussaat erfolgte in 24 Well-Gewebekulturplatten in einer Dichte von 8,4x10^3 Zellen/cm^2. Nach 48 h Kultivierung bei 37°C und 5 % CO_2 wurde ein WST-1-Assay durchgeführt.

2.5.1.4 Durchführung des WST-1-Assays

Die Zellviabilität wurde nach 48 Stunden Inkubation in KM mit entsprechendem Zusatz an Prüfsubstanz getestet. Nach zweimaligem Waschen mit 37°C warmem PBS wurden 500 µl frisches KM in die Wells gefüllt, mit 50 µl WST-1 Reagens versetzt und für 4 h bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Danach konnte die Absorption bei 440 nm am Spektrophotometer gemessen werden. Es wurde neben der Kontrollgruppe, die nur KM ohne Testsubstanz enthielt, eine weitere Gruppe zur Bestimmung des Leerwertes in die Vermessung einbezogen. Darin wurde die Absorption des Mediums, welches WST-1-Reagens enthielt, gemessen, ohne dass Zellen ausgesät wurden. Der Mittelwert der Absorptionswerte dieser Gruppe wurde von den anderen Ergebnissen subtrahiert, um den Einfluss des Mediums und des Materials so gering wie möglich zu halten.

2.6 Kultivierung von primären OB

Für die Zellversuche wurden primäre OB eingesetzt, die nach einer adaptierten Methode aus dem „Bone Research Protocol 2012“ isoliert wurden. Dabei wurde eine Mischfraktion aus Fraktionen III und IV eingesetzt.

2.6.1 Kultivierung von primären OB

Als KM diente 10 % α-MEM. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5 % CO_2, wobei jeden zweiten Tag ein Medientausch vorgenommen wurde.

2.6.2 Zellaussaat auf Gewebekultur-Deckglasbeschichtungen

Die Zellversuche auf den Deckglasbeschichtungen wurden in 24 Well-Gewebekulturplatten durchgeführt. Die Aussaat der primären OB erfolgte in 100 µl Zellsuspension in KM mit einer Zelldichte von $2{,}5x10^5$ Zellen/cm^2. Nach 15 min Inkubation bei 37°C und 5 % CO_2 wurde mit KM (37°C) auf das Arbeitsvolumen von 0,5 ml aufgefüllt. Es wurde auf gleiche Weise eine Vergleichsgruppe auf Gewebekultur-Deckgläsern in den Versuch integriert. Als Kontrolle dienten primäre OB auf einer 24 Well-Gewebekulturplatte in einer Dichte von $4{,}4x10^4$ Zellen/cm^2, die als Suspension in 0,5 ml KM ausgesät wurden.

2.6.3 Zellaussaat auf Hydrogelplättchen

Für die Austestung der primären OB auf den Hydrogelplättchen wurde in 48 Well-Gewebekulturplatten gearbeitet. Die optimierte Aussaat erfolgte durch Aufbringung eines 25 µl Tropfens einer hoch konzentrierten Zellsuspension in KM auf das entsprechend vorbereitete Hydrogelplättchen. Nach 90 min Vorinkubation bei 37°C und 5 % CO_2 wurden 0,5 ml KM (37°C) ergänzt. Die Zelldichte lag bei $4{,}3x10^5$ Zellen/cm^2. Die Kontrollgruppe wurde auf einer 48 Well-Gewebekulturplatte in einer Zelldichte von $8{,}4x10^4$ Zellen/cm^2 als Suspension in 0,5 ml KM angesetzt.

	Platte	**Wachstums-fläche**	**Zelldichte** Zellen/cm^2	**Mio/ Pl.**
Kontrolle, Gewebekulturplatte	24 Well	1,9 cm^2	$4{,}4x10^4$	2
Deckglasbeschichtung (13 mm)	24 Well	1,33 cm^2	$2{,}5x10^5$	8
Kontrolle, Gewebekulturplatte	48 Well	1,0 cm^2	$8{,}4x10^4$	4
Hydrogelplättchen, Gießform (7 mm)	48 Well	0,385 cm^2	$4{,}3x10^5$	8

Tabelle 5: Übersicht der Zelldichten bei der Aussaat für die jeweiligen Experimente.

2.6.4 Mineralisationsassay

Um zu testen, wie sich das 10 % GelMA-Hydrogel auf die Differenzierung primärer OB auswirkte, wurde diese gezielt durch Zusatz von Vit.C stimuliert. Dieses spielt für den Mineralisationsprozess eine wichtige Rolle, da es steigernd auf die Zellproliferation und die Exprimierung von Proteinen (u.a. ALP) wirkt. Zudem besitzt Vit.C als Cofaktor der Hydroxylierung von Lysin und Prolin eine wichtige Funktion in der Kollagenbiosynthese (Xiao 1997), (zur Nieden, et al. 2003). Das für die Mineralisation erforderliche organische Phosphat wurde durch den Zusatz von β-GP zum KM bereitgestellt.

2.6.4.1 Kultivierung in MM

Um auf die Differenzierung und die Mineralisationsfähigkeit von primären OB zu testen, wurden die Versuchsgruppen ab dem Zeitpunkt der Konfluenz (Tag 0) mit MM bei 37°C und 5 % CO_2 weiterkultiviert. Dieses bestand aus KM mit Zusatz von Vit.C (50 µg/ml) und β-GP (10 mM). Die Kontrollgruppe wurde in KM bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert. Die Aktivität der ALP wurde bei den Deckglasbeschichtungen an den Tagen 1, 4 und 7 bestimmt. Bei den Hydrogelplättchen wurde die ALP-Färbung nur noch an Tag 4 durchgeführt. Die Matrixmineralisation auf den Hydrogelplättchen wurde am Tag 14 durch einen kolorimetrischen Ca-Assay überprüft.

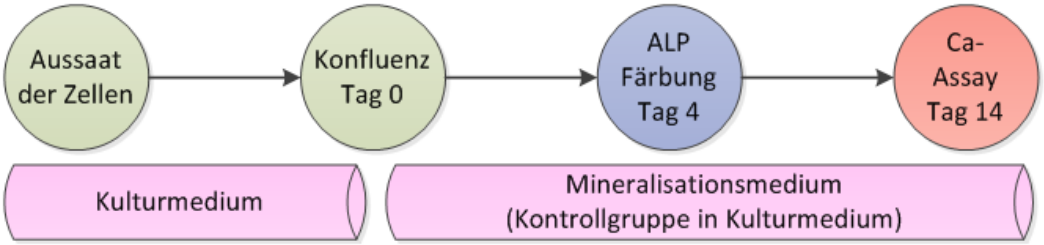

Abb. 12: Schematische Darstellung der Kultivierung für das Mineralisationsassay.

2.6.4.2 Färbung der ALP

Die Aktivität der ALP stellt einen wichtigen Parameter für die Beurteilung der Differenzierung von primären OB dar. Sie wurde mittels BCIP/NBT-Farbreagens (SigmaFast™) nachgewiesen. Dabei liegt ein Substrat-System aus 5-Brom-4-chlor-3'-indolylphosphat (BCIP) und Nitro-Blue-Tetrazoliumchlorid (NBT) vor. BCIP ist Substrat der ALP und wird bei gemeinsamer Inkubation hydrolysiert. Das Produkt dimerisiert durch Tautomerisierung und gibt Wasserstoffatome frei, die zur Hydrolysierung von NBT führen, wodurch ein unlösliches, blauviolett gefärbtes Diformazan entsteht (Moe and Kirkeby 1982). Die Durchführung entspricht der Firma Promocell GmbH (Germany).

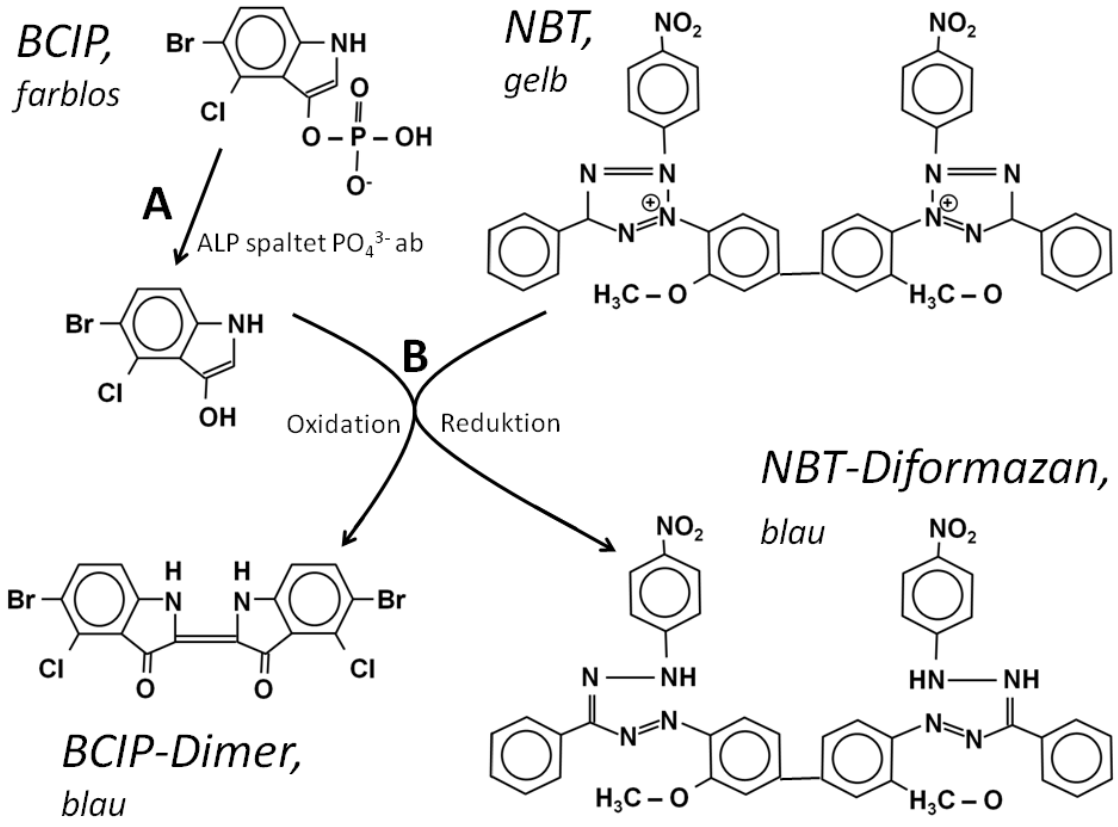

Abb. 13: Reaktionsschema der ALP-Färbung mit BCIP/NBT-Reagens: Im ersten Schritt (A) erfolgt die Hydrolyse des BCIP durch die ALP (Phosphatrest wird abgespalten), welches in einem zweiter Schritt (B) durch Tautomerisierung dimerisiert. Die freiwerdenden H-Atome hydrolysieren NBT und es bildet sich ein unlösliches, blauviolett gefärbtes Diformazan.

2.6.4.3 Durchführung der ALP-Färbung

Die Zellen wurden am Tag 4 (in Versuchen auf den Deckglasbeschichtungen zusätzlich an Tagen 1 und 7) des Mineralisationsassays einmal mit 0,5 ml 37°C warmem PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen wurde mit 3,7 % gepufferter Formaldehyd-Lösung für 60 sek vorgenommen. Nach einem Waschschritt mit Waschpuffer wurden die Zellen mit dem BCIP/NBT-Farbreagens für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbung wurde mit einem weiteren Waschen mit Waschpuffer beendet. Zur Aktivitätsanalyse der ALP wurde die gefärbte Platte am Farbscanner eingelesen und mikroskopische Aufnahmen eines repräsentativen Ausschnittes der Zellschicht gemacht.

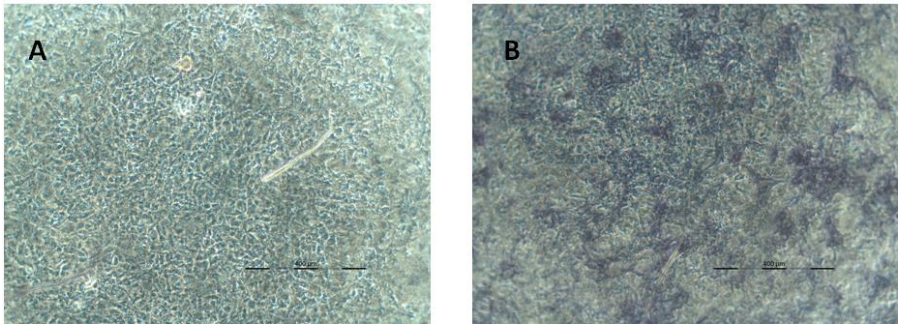

Abb. 14: Ergebnisse der ALP-Färbung: mikroskopische Aufnahmen (10x Vergrößerung) von primären OB vor (A) und nach (B) der ALP-Färbung bei Kultivierung in MM auf Gewebekulturplatten.

2.6.5 Ca-Assay

Für den Nachweis von gebundenem Ca in der extrazellulären Matrix wurde die Bildung eines Farbkomplexes zwischen o-Kresolphthalein und Ca^{2+}-Ionen genutzt (Morin 1974). Die Durchführung des Ca-Assays erfolgte mit einem Kit (Calcium Colorimetric Assay Kit, Sigma-Aldrich) nach 24 h Extraktion am Tag 14 des Mineralisationsassays. Das Reaktionsprodukt wurde bei einem Absorptionsmaximum von 575 nm spektrophotometrisch vermessen.

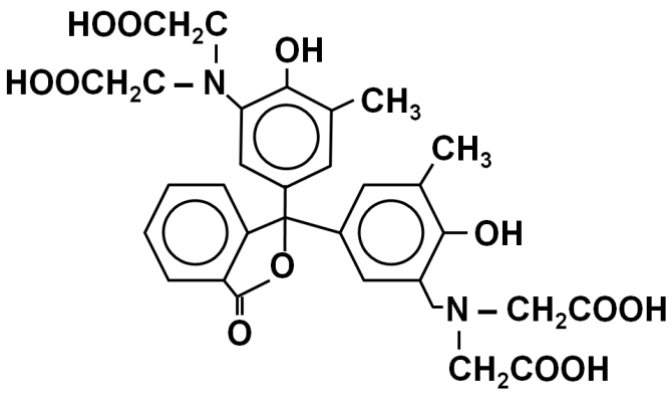

Abb. 15: Chemische Struktur von o-Kresolphthalein, das im Assay einen Komplex mit Ca^{2+}-Ionen bildet.

2.6.5.1 Durchführung des Ca-Assays

Der Ca-Assay wurde gemäß des Protokolls der Herstellerfirma (Sigma-Aldrich) durchgeführt. Die Gruppen wurden in Triplikaten vermessen und die Ergebnisse statistisch mittels „One-way Anova“ mit anschließendem „Tukey Post-hoc“ ausgewertet. Die Wells wurden am Tag 14 zweimal mit warmem PBS gewaschen und mikroskopische Aufnahmen der Zellen sowie der mineralisierten Matrix gemacht. Es folgte der Zusatz von 250 µl 0,5 N Essigsäure, in der das in der Matrix gebundene Ca für 24 h unter starkem Rütteln extrahiert wurde. Die Flüssigkeit wurde in Eppendorfgefäßen gesammelt und zum Abtrennen von Zellresten für 5 min bei 6000 Umdrehungen/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Konzentrationen wurden in einer Zweifachbestimmung vermessen. 25 µl des Überstandes wurden in einer Mikrotiterplatte mit MilliQ Wasser auf 50 µl ergänzt, mit 90 µl chromogenem Reagens und 60 µl Pufferlösung, welche im Kit enthalten waren, versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach konnte die Ca-Konzentration mittels Absorptionsmessung bei 575 nm vermessen werden.

2.6.5.2 Quantifizierung des Ca-Assays

Für die Quantifizierung des extrahierten Ca wurde die Absorption bei 575 nm gegen eine Ca-Standardkurve vermessen.

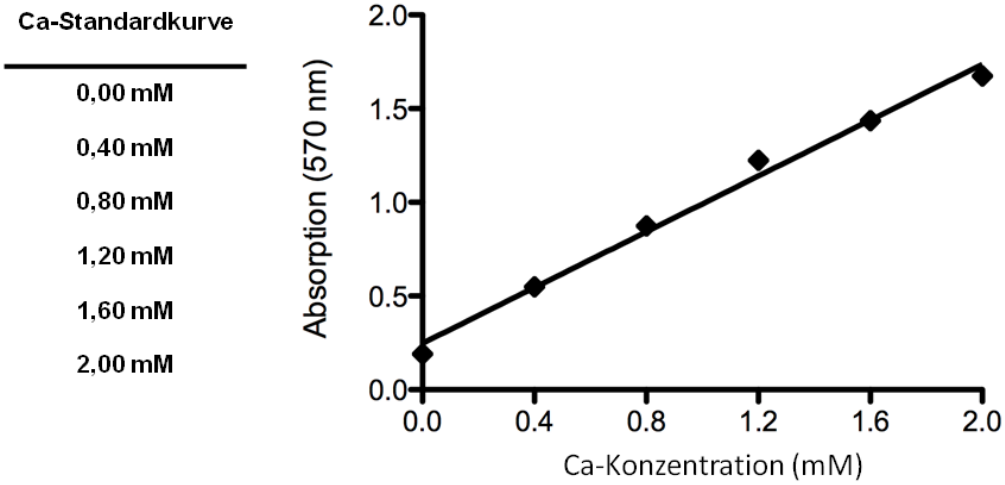

Abb. 16: Ca-Standardkurve zur Konzentrationsbestimmung (mM).

2.6.6 Alizarin Rot S (ARS)-Färbung

Ca, welches aktiv in die Matrix eingelagert wird, kann mittels Alizarin Rot S gefärbt werden (Gregory, et al. 2004). Am Tag 14 des Mineralisationsassays erfolgte die Fixierung der Zellen nach drei Waschschritten mit 4°C kaltem PBS. Dazu wurden die OB mit 20°C kaltem Ethanol (70%) versetzt und für 1h bei 4°C im Kühlschrank auf Eis gelagert, bevor 2x mit MilliQ Wasser gewaschen wurde. Die frisch bereitete ARS-Farblösung (40 mM) wurde zugesetzt und die Zellen für 10 min am Schüttler unter Lichtschutz gefärbt. Die Reste der Farblösung wurden durch 5 Waschgänge mit MilliQ Wasser entfernt und abschließend wurde 1x für 15 min am Schüttler mit PBS gewaschen. Die Platten wurden nach Entfernung der restlichen Flüssigkeit gescannt und mikroskopische Aufnahmen der gefärbten Mineralisation gemacht.

2.6.7 Von Kossa-Färbung

Der Nachweis von Ca-Einlagerungen mittels Von Kossa-Färbung erfolgte indirekt, indem Ca^{2+}-Ionen durch Silberionen ersetzt wurden, welche anschließend zu elementarem, schwarz gefärbtem Silber reduziert wurden (Rungby, et al. 1993). Die Zellen wurden am Tag 14, nachdem sie 1x mit 37°C warmem PBS gewaschen wurden, mit 4°C kalter 10 % Formalin-Lösung (neutral gepuffert) versetzt und für 15 min im Kühlschrank fixiert. Es folgten drei Waschschritte mit MilliQ Wasser. Die Wells wurden vollständig getrocknet, bevor 5 % Silbernitrat-Lösung zugesetzt wurde. Die Platten wurden zur Färbung für 1 h unterm LAF mit UV-Licht bestrahlt und danach 6x mit MilliQ Wasser gewaschen. Die Wells wurden 1x für ca. 10 sek mit 5 % Natriumthiosulfat-Lösung gewaschen. Abschließend wurde noch 3x mit MilliQ Wasser gewaschen, die Flüssigkeit entfernt und die Platten gescannt, sowie mikroskopische Aufnahmen der Zellschichten gemacht.

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhaltenen Daten sowie die Erstellung der entsprechenden Graphen erfolgte mit dem Programm PRISM 5.0. Die Angabe der Ergebnisse erfolgte als Mittelwert ± Standardfehler (SEM, standard error of the mean). Statistische Signifikanz war ab einem p-Wert von kleiner 0,05 gegeben und wurde durch t-Test beziehungsweise „One-way Anova“ mit anschließendem „Tukey Post-hoc“ festgestellt.

2.8 Herstellung der Nährmedien

2.8.1 Kulturmedium

Als Kulturmedium (KM) diente α-Minimal Essential Medium (α-MEM), dem 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS hi) und 1 % einer Lösung von Penicillin-/ Streptomycin (P/S) zugesetzt wurden.

2.8.2 Mineralisationsmedium

Das Mineralisationsmedium (MM) bestand aus KM, dem 50 µg/ml Vit.C und 10 mM β-GP in Form von Stammlösungen direkt vor Gebrauch zugesetzt wurden.

2.9 Reagenzienherstellung

2.9.1 Alizarin Rot S-Farblösung (40 mM)

10 ml einer Alizarin Rot S-Farblösung (40 mM) wurden hergestellt, indem 0,13692 g Alizarin Rot S genau eingewogen wurden und am Magnetrührer in 10 ml MilliQ Wasser gelöst wurden. Der pH-Wert der Lösung wurde mit einer 1 % Ammoniumhydroxidlösung auf einen Wert zwischen 4,2 - 4,4 eingestellt. Die Lösung wurde durch einen Faltenfilter filtriert und bis zu deren Anwendung unter Lichtschutz aufbewahrt.

2.9.2 Ascorbinsäure-Stammlösung (100x Vit.C)

10 ml einer 100x Vit.C-Stammlösung wurden hergestellt, indem 50 mg Vit.C in 10 ml PBS gelöst wurden. Die Lösung wurde steril filtriert (0,22 µm Filter) und konnte portioniert bei -20°C bis zu einem Monat lang gelagert werden.

Für eine Konzentration von 50 µg/ml wurde eine 1:100 Verdünnung eingesetzt.

2.9.3 BCIP/NBT-Farbreagens

Zur Herstellung des BCIP/NBT-Farbreagens wurde eine Tablette (BCIP/NBT, SigmaFast^{TM}) durch Vortexen in 10 ml MilliQ Wasser gelöst. Die Lösung wurde unmittelbar vor der Anwendung und unter Lichtausschluss hergestellt.

2.9.4 0,5 N Essigsäure

Für die Herstellung einer 0,5 N Essigsäure wurde Eisessig (MG=60,05; Dichte=1,05 g/cm^2; entsprechend 17,5 M) 1:35 mit MilliQ Wasser verdünnt.

2.9.5 FCS hi

Die Hitzeinaktivierung des FCS fand für 30 min bei 56°C am Wasserbad statt. Störende Einflüsse von im Serum enthaltenen Enzymen konnten dadurch reduziert werden.

2.9.6 3,7 % Formaldehydlösung

Für die Herstellung einer 3,7 % Formaldehydlösung wurde eine 37 % Formaldehydlösung 1:10 mit PBS verdünnt.

2.9.7 β-Glycerophosphat-Stammlösung (100x β-GP)

10 ml einer 100x β-GP-Stammlösung wurden hergestellt, indem 2,16 g β-GP in 10 ml MilliQ Wasser gelöst wurden. Die Lösung wurde steril filtriert (0,22 µm Filter) und konnte portioniert bei -20°C bis zu einem Monat gelagert werden.

Für eine Konzentration von 10 mM wurde eine 1:100 Verdünnung eingesetzt.

2.9.8 5 % Natriumthiosulfat-Lösung

10 ml einer 5 % Natriumthiosulfat-Lösung wurden hergestellt, indem 0,50 g $Na_2S_2O_3$ mit MilliQ Wasser zur 10 ml Marke aufgefüllt wurden und darin gelöst wurden.

2.9.9 PBS

1000 ml einer 10x PBS-Lösung wurden hergestellt, indem 2,00 g KCl, 2,00 g KH_2PO_4, 80,00 g NaCl und 27,07 g $Na_2HPO_4 \bullet 2H_2O$ eingewogen wurden, mit bidestilliertem Wasser zur 1000 ml Marke aufgefüllt und darin gelöst wurden. Nach Verdünnung auf 1x mit MilliQ Wasser wurde die Lösung steril filtriert (0,22 µm Filter) und bei 4°C gelagert.

2.9.10 Phosphatpuffer pH 8,5

1000 ml eines Phosphatpuffers pH 8,5 wurden hergestellt, indem 8,40 g $NaHCO_3$ mit bidestilliertem Wasser zur 1000 ml Marke aufgefüllt wurden und darin gelöst wurden. Der pH wurde mit 1 N HCl und 5 N NaOH auf einen Wert von 8,5 eingestellt.

2.9.11 10 % SDS-Lösung

100 ml einer 10 % SDS-Lösung wurden hergestellt, indem 10,00 g SDS mit MilliQ Wasser zur 100 ml Marke aufgefüllt und darin gelöst wurden.

2.9.12 1 N HCl

Für die Herstellung einer 1 N HCl wurde eine 37 % HCl 1:10 mit MilliQ Wasser verdünnt.

2.9.13 5 % Silbernitrat-Lösung

10 ml einer 5 % Silbernitratlösung wurden hergestellt, indem 0,50 g $AgNO_3$ mit MilliQ Wasser zur 10 ml Marke aufgefüllt und darin gelöst wurden.

2.9.14 0,1 % TNBS-Lösung

Für die Herstellung einer 0,1 % TNBS-Lösung wurde eine 5 % TNBS-Lösung 1:50 mit Phosphatpuffer pH 8,5 verdünnt.

2.9.15 Waschpuffer

Für die Herstellung des Waschpuffers wurden PBS 0,05 % Tween 20 zugesetzt.

2.10 Reagenzien

Substanz	Substanzname lt. Packungs-Etikette	Firmenname	Chargen-Nummer
Vit.C	L(+)-Ascorbinsäure (Vitamin C)	Merck	841F971227
α-MEM	MEM Alpha Medium	Gibco	1431514
$AgNO_3$	Silver nitrate	Sigma-Aldrich	Lot#MKBQ3322V
Alizarin Rot S	Alizarin Red S	Sigma-Aldrich	Lot#030M1776
BCIP/NBT	SIGMAFAST™ BCIP®/NBT	Sigma-Aldrich	Lot#SLBL4686V
Ca-Assay Kit	Calcium Colorimetric Assay	Sigma-Aldrich	Lot#B9K040380V
Essigsäure, Eisessig	Acetic Acid, Glacial 99+%	Sigma Chemical	Lot38H3418
Ethanol	Ethanol absolut, 99,9%	AustrAlco Handelsges.m.b.H	Lot.AAAH-502007025-010711
FCS	Foetal Calf Serum	Gibco	Lot#41Q4031K
Formaldehyd 37%	Formaldehydlösung 37%, Ph.Eur., BP, USP	Roth	Ch.Nr.460163407
Formalin 10 %	Formalin solution, neutral buffered, 10 %	Sigma-Aldrich	Lot#SLBH1382V
Gelatine B	Gelatin, from bovine skin Type B	Sigma-Aldrich	Lot#051M0012V
β-GP	β-Glycerophosphate disodium salt hydrate	Sigma-Aldrich	Lot#SLBB5458V
1 N HCl	32% HCl	Sigma-Aldrich	Nr. 30720
Irgacure 2959	2-Hydroxy-$'-(2-hydroxythoxy)-2-methylpropiophenone (98%)	Sigma-Aldrich	Lot#MKBQ5185V
KCl	Kaliumchlorid	Merck	K33076636428
KH_2PO_4	Kaliumhydrogen-phosphat	Merck	A531473438
Methacrylsäure-	Methacrylic anhydride	Sigma-Aldrich	Lot#STBD9997V

Anhydrid	contains 2,000 ppm topanol A as inhibitor, 94%		
NaCl	Sodium chloride	Sigma-Aldrich	Lot#087K0182
$NaHCO_3$	Sodium bicarbonate	Sigma-Aldrich	Batch#035K0074
$NaH_2PO_4 \bullet H_2O$	Natriumhydrogen-phosphat-1-hydrat	Merck	9698729
$Na_2S_2O_3$	Sodium thiosulfate	Sigma-Aldrich	Lot#BCBK1826V
5 N NaOH		Chemlabs	21.2993005.100
P/S	Penicillin/Streptomycin-Lösung, 10.000 µg/ml	Biochrom AG	Lot. 330FF
SDS	SDS/ Natriumlaurylsulfat ≥99% für die Biochemie	Roth	Chage480158783
5% TNBS	Picrylsulfonic acid solution 5% (w/v) in H_2O	Sigma-Aldrich	Lot#SLBK1620V
Tween 20	TWEEN®20	Sigma-Aldrich	Lot#SZBE2460V
WST-1-Reagens	Cell Proliferation Reagent (WST-1)	Roche	Lot14310400

Tabelle 6: Liste der verwendeten Reagenzien

2.11 Materialien

Bezeichnung	Herstellerfirma
24 und 48 Well-Gewebekulturplatten	Nunc Thermo Fisher Scientific Inc., USA Greiner® Bio-One International AG, Ö
96 Well Mikrotiterplatten, ELISA-Platte Microlon 96 K	Greiner® Bio-One International AG, Ö
Deckgläser	VWR, Germany
Gewebekultur-Deckgläser, NUNC Thermanox® Plastic Coverslips (Ø=13 mm)	Thermo Fischer Scientific, NY, USA
Dialyserezylinder, Spectra/Por® MAXI	Spectrum Laboratories, Inc., Netherlands
Dialysenschläuche, Spectra/Por® 4, Standard RC Tubing, MWCO: 12-14 kD	Spectrum Laboratories, Inc., Netherlands
Dialyseklemmen, Universal Closures	Spectrum Laboratories, Inc., Netherlands
Eppendorf-Röhrchen 1,5 ml	Eppendorf AG, Deutschland
Faltenfilter	Whatman, GE Healthcare, UK
Gelhandler™	Diversified Biotech Inc., Dedham, MA
Glaspipetten	Brand, Deutschland
Mikropipetten (1000, 100, 10 µl)	Labsystems Finnpipette
Objektträger, Microscope Slides	VWR International
Parafilm “M“ Laboratory Film	Bemis®, USA
Pipettenspitzen	VWR International, Ö Greiner ® Bio-One International AG, Ö
Spacer (Silikon), Casting Base TV100Seals	Carl Roth, Cat.Nr. Y013.1
Spacer (Teflon)	BIO RAD, Zubehörteil, Mini-Protean® II Elektrophorese-Kammer
Spritze 10 ml	BD, USA
Sterilfilter 0,22 µm	Millex®GV 0,22 µm, Millipore, GE Walter&Process, USA
Zentrifugenröhrchen, Cellstar® (15 und 50 ml)	Greiner ® Bio-One International AG, Ö

Tabelle 7: Liste der verwendeten Materialien

2.12 Geräte

Bezeichnung	Herstellerfirma
Analysenwaagen	MC 210 P, Sartorius GFL 3032, Sartorius
Autoklav	TOMY SX-300E High pressure steam sterilizer
Digitalkamera (Mikroskop)	Nikon D 5100, Japan ProgRes® Speed XT core 5, Jenoptik, Deutschland
Eismaschine	AF 103, Scotsman
Gefrierschrank	Tiefkühlschrank U535 Innova, Eppendorf, New Brunswick
Handy-Kamera	Samsung GT-S7562
Inkubator	Heraeus, HERA cell 240, Kendro
Kühlschrank	Kühl-/Gefrierkombi, Mediline LCexv 4010, Liebherr
LAF, Sterilwerkbank ET 130 Kl.2	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Deutschland
Lyophilisator, Gefriertrocknungsanlage	RIEGER Industrievertretungen GmbH, Wien
Lichtmikroskop	Nikon TMS H550S, Japan
Magnetrührer	Ikamag RCT, Janke & Kunkel, Deutschland
Mikroliterpipetten	Eppendorf Research Pipetman, Gilson, Frankreich Finnpipette Gigital ACL, Labsystems, Finnland
pH-Meter	713 Metrohm, Schweiz
Pipetboy	IBS Integra Biosciences
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann
Scanner	Epson Perfection 1200PHOTO, Epson
Schüttelinkubator	GFL 2032, Heraeus instruments, Deutschland
Schüttler	Swip, Edmund Bühler Typ KL-2 Seriennummer: 3320IE0518
Spektrophotometer	Infinite 200 Pro Microplate Reader, Tecan/ Seriennummer: 1010001524
Stanze, Hollow Punch	DAREX outilage, France
Ultraschallbad, TranssonicT570	Elma®, AIGNER, Wien, Österreich

UV-Crosslinker	CL-1000L, LTF Labortechnik
Vortexer	Vortex Genie 2, Bender & Hobein AG
Wasserbad mit Schüttelfunktion	Schüttelwasserbad 1083, GFL, Deutschland
Zentrifuge	Z323 K, Hermle Sorvall RT7 Rotor RT-H250, Dupont

Tabelle 8: Liste verwendeter Geräte

3 Resultate

Erster Schritt war die Synthese der GelMA. Von Interesse war, welche Menge des Produktes gebildet wurde (Ausbeute) und ob die Reaktion zur Zielstruktur erfolgreich stattgefunden hatte. Dazu wurde mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie das Vorliegen der polymerisationsaktiven Methacryl-Funktionen im GelMA-Molekül nachgewiesen und deren Anzahl anhand des Substitutionsgrades (DS) ermittelt. Für die Bestimmung des DS kamen zwei unterschiedliche Methoden (Habeeb-Test und quantitative ^{1}H-NMR-Spektroskopie) zur Anwendung, die im Anschluss verglichen werden konnten.

Die Hydrogele wurden mittels UV-Polymerisation unter Einsatz des PI Irgacure 2959 hergestellt. Dabei wurden drei unterschiedliche Herstellungsverfahren angewandt, die anhand der Eignung für den Einsatz in der Zellkultur beurteilt wurden. Die 10 % GelMA-Lösungen wurden als (1) Direktbeschichtung von Wells, (2) Deckglasbeschichtung oder (3) in Gießformen polymerisiert. Die Charakterisierung eines Hydrogels mit einer PI-Konzentration von 2 mg/ml anhand des Quellungsfaktors und Gelfraktion diente dazu, die mechanischen Eigenschaften des Biomaterials abzuschätzen. Die Herstellung eines Hydrogels, welches sich zur Austestung an primären OB eignete, konnte erfolgreich umgesetzt werden.

Der Einfluss der Hydrogel-Komponenten wurde mittels Viabilitätstests (WST-1-Assays) charakterisiert. Es wurden (1) der PI Irgacure 2959 (aktiviert und inaktiv), sowie (2) GelMA in jeweils vier unterschiedlichen Konzentrationen zum KM zugesetzt und der WST-1-Assay nach 48 h Inkubation durchgeführt. Bei dem PI wurde eine Unterscheidung zwischen aktiviertem und inaktivem Zustand erreicht, indem nur eine der beiden parallel angesetzten Platten für 10 min mit UV-Licht bestrahlt wurde. Die Viabilität war nur in der Gruppe signifikant herabgesetzt, in der die Aktivierung des PI durch UV-Licht stattgefunden hatte. Bei der Austestung von GelMA konnte eine Hemmung der Viabilität nur bei einer Konzentration von 2 % beobachtet werden, niedrigere Konzentrationen hatten keinen Einfluss auf die Zellviabilität.

Ob sich das Hydrogel als Knochenersatzmaterial eignete wurde *in-vitro* an primären OB ausgetestet. Die Methode der Zellaussaat musste zunächst wegen mangelnder Anhaftung der Zellen am Material optimiert werden.

Auf den Deckglasbeschichtungen konnte die Aktivität der ALP an den Tagen 1, 4 und 7 nach Zusatz des MM (50 µg/ml Vit.C und 10 mM β-GP) bestimmt werden. Die ALP konnte an allen Zeitpunkten nachgewiesen werden, was auf das Vorliegen von differenzierenden OB schließen lässt. Es konnte kein Unterschied zwischen den einzelnen Hydrogelgruppen verzeichnet werden. Ein Nachweis der Matrixmineralisation konnte auf der dünnen Deckglasbeschichtung nicht durchgeführt werden, da diese über eine zu geringe mechanische Stabilität für die Dauer des Experimentes verfügte. Es wurden daher dickere Hydrogele hergestellt.

Auf den ausgestanzten Hydrogelplättchen in zwei unterschiedlichen PI-Konzentrationen (2 und 6 mg/ml) konnte auf die Differenzierung und Mineralisation von primären OB getestet werden. Die ALP-Aktivität wurde nur noch am Tag 4 durchgeführt und war in allen mit MM behandelten Gruppen vorhanden. Auch hier wurde kein Unterschied zwischen den getesteten Hydrogelgruppen beobachtet. Die Hydrogelplättchen waren für die gesamte Dauer bis Tag 14 stabil und zeigten gute Eignung für die Kultivierung von primären OB. Die Mineralisationsfähigkeit wurde als Indikator für das Vorliegen ausdifferenzierter OB mittels eines Ca-Assays nachgewiesen. In allen MM-Gruppen war die Ca-Konzentration im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant erhöht und die Mineralisation sehr stark ausgebildet.

Zusammengefasst konnte ein Biomaterial hergestellt werden, welches sich aufgrund seiner Osteokonduktivität und Osteoinduktivität als Knochenersatzmaterial eignet und für weitere Versuche charakterisiert wurde.

3.1 Synthese und Charakterisierung von GelMA

Zur Charakterisierung der Syntheseprodukte wurde die Ausbeute bestimmt, die Einführung polymerisationsaktiver Methacryl-Gruppen mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie überprüft und der DS mit zwei unterschiedlichen Methoden bestimmt. Die Synthese wurde immer im selben Verhältnis von Gelatine B zu Methacrylsäureanhydrid (2:1) angesetzt, um festzustellen, ob die Umsetzung auf reproduzierbare Weise durchführbar war.

3.1.1 Produktausbeute der GelMA-Synthese

Die Ausbeute lag bei allen Synthesen bei etwa 0,7 g/ 1 g eingesetzter Gelatine B (GelMA-1 0,923 g, GelMA-2 0,666 g, GelMA-3 0,668 g und GelMA-4 0,732 g).

3.1.2 Produktanalyse mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie

3.1.2.1 Nachweis der Methacryl-Funktion im GelMA-Molekül

Bei Betrachtung der ^{1}H-NMR-Spektren der Syntheseprodukte (GelMA) waren die Signale der Methacryl-Funktion bei 5,3 ppm sowie bei 5,5 ppm in allen vier Chargen vorhanden. Im Spektrum der Gelatine B (GelB), welche natürlich keine Methacryl-Substituenten trägt, fehlten diese. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Einführung der Methacryl-Funktion erfolgreich stattgefunden hatte.

3.1.2.2 Ermittlung des Substitutionsgrades mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie

Die Stoffmenge methacrylierter ε-Aminogruppen wurde anhand des Verhältnisses der Peakflächen von den Methacryl-H-Atomen zu den Peakflächen der Amin-Wasserstoffe ermittelt. Pro Gramm GelMA waren etwa 0,3 mmol dieser polymerisationsaktiven Funktionen vorhanden. Der Substitutionsgrad (DS) konnte aus dem Verhältnis der entsprechenden Stoffmenge an methacrylierten Seitenketten zu der Stoffmenge an freien ε-Aminogruppen (0,385 mmol/g Gelatine B) berechnet werden. Die Werte für den DS lagen zwischen 66,73 und 78,08%.

		chem. Verschiebung (ppm)	Integral dieses Signals	Stoff-menge (mmol/G)	DS (einzeln)	DS
GelMA-1	Gelatine	0,715-0,769	12,82	-	-	
	Methacryl-H 1	5,269-5,301	0,99	0,2965	77,023 %	
	Methacryl-H 2	5,505-5,550	1,00	0,2995	77,801 %	**77,41 %**
GelMA-2	Gelatine	0,756-0,809	15,47	-	-	
	Methacryl-H 1	5,307-5,338	1,07	0,2656	68,986 %	
	Methacryl-H 2	5,543-5,586	1,00	0,2482	64,473 %	**66,73 %**
GelMA-3	Gelatine	0,69-0,91	12,90	-	-	
	Methacryl-H 1	5,29-5,38	1,00	0,2977	77,318 %	
	Methacryl-H 2	5,51-5,61	1,00	0,2977	78,318 %	**77,32 %**
GelMA-4	Gelatine	0,756-0,808	11,56	-	-	
	Methacryl-H 1	5,308-5,340	0,81	0,2691	69,887 %	
	Methacryl-H 2	5,546-5,595	1,00	0,3322	86,281 %	**78,08 %**

Tabelle 9: Ergebnisse der quantitativen ^{1}H-NMR-Spektroskopie: Anhand der Integrale der Peaks im Spektrum konnte die Stoffmenge der enthaltenen funktionellen Gruppen in GelMA ermittelt werden. Daraus konnte der DS berechnet werden.

3.1.3 Ermittlung des DS mittels Habeeb-Test

Durch einen kolorimetrischen Nachweis freier ε-Aminogruppen mit TNBS (2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure) konnte die Menge methacrylierter Seitengruppen bestimmt werden und der DS ermittelt werden. Dieser lag zwischen 66,90 und 79,33 %. Dass dieser Bereich sehr schmal ausfällt, ist darauf zurückzuführen, dass das Ansatzverhältnis der Reagenzien immer gleich gehalten wurde. Für den DS der GelMA-1 ergab sich ein signifikant (** p<0,01) höherer Wert im Vergleich zu den drei anderen GelMA-Chargen, deren DS keine signifikanten Abweichungen untereinander zeigten.

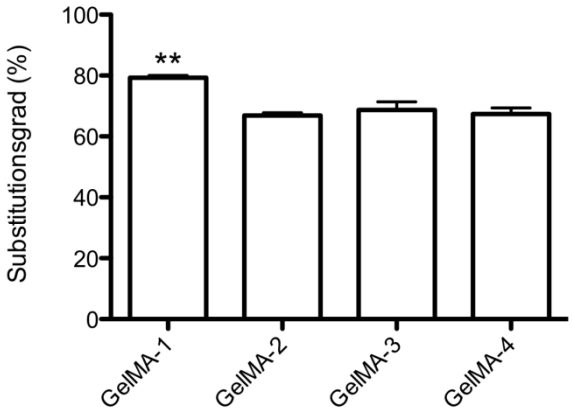

Abb. 17: Graphische Darstellung der Ergebnisse für den DS der vier GelMA-Chargen mittels Habeeb-Tests (%; Mittelwert ± SEM; n=4-5; ** p<0,01). GelMA-1 zeigte einen signifikant (** p<0,01) kleineren DS-Wert als die übrigen Syntheseprodukte, welche in einem einheitlichen Bereich von 66,90-68,71% lagen.

3.1.4 *Vergleich der Werte für den DS ermittelt durch zwei unterschiedliche Methoden (^{1}H-NMR-Spektroskopie und Habeeb-Test)*

Die Ergebnisse, die man für den Substitutionsgrad erhielt, wurden zum Methodenvergleich auf Übereinstimmung statistisch überprüft. Dabei konnte für die Ergebnisse keine signifikante Abweichung der GelMA-Chargen zueinander beobachtet werden.

	^{1}H-NMR-Spektroskopie	**Habeeb-Test**	**Abweichung**
GelMA-1	77,41 %	79,33 ± 1,463 %	nicht signifikant
GelMA-2	66,73 %	66,90 ± 2,021 %	nicht signifikant
GelMA-3	77,32 %	68,71 ± 5,978 %	nicht signifikant
GelMA-4	78,08 %	67,35 ± 4,581 %	nicht signifikant

Tabelle 10: Ergebnisse der Bestimmung des Substitutionsgrades mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie und Habeeb-Test sowie deren Übereinstimmung.

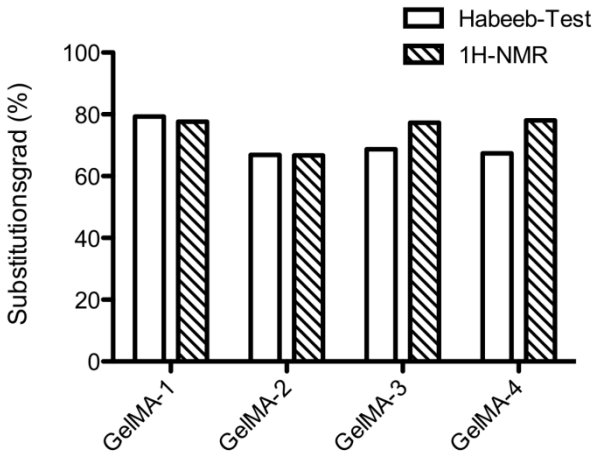

Abb. 18: Methodenvergleich von ^{1}H-NMR und Habeeb-Test zur Bestimmung des DS (%).

Gelatine B

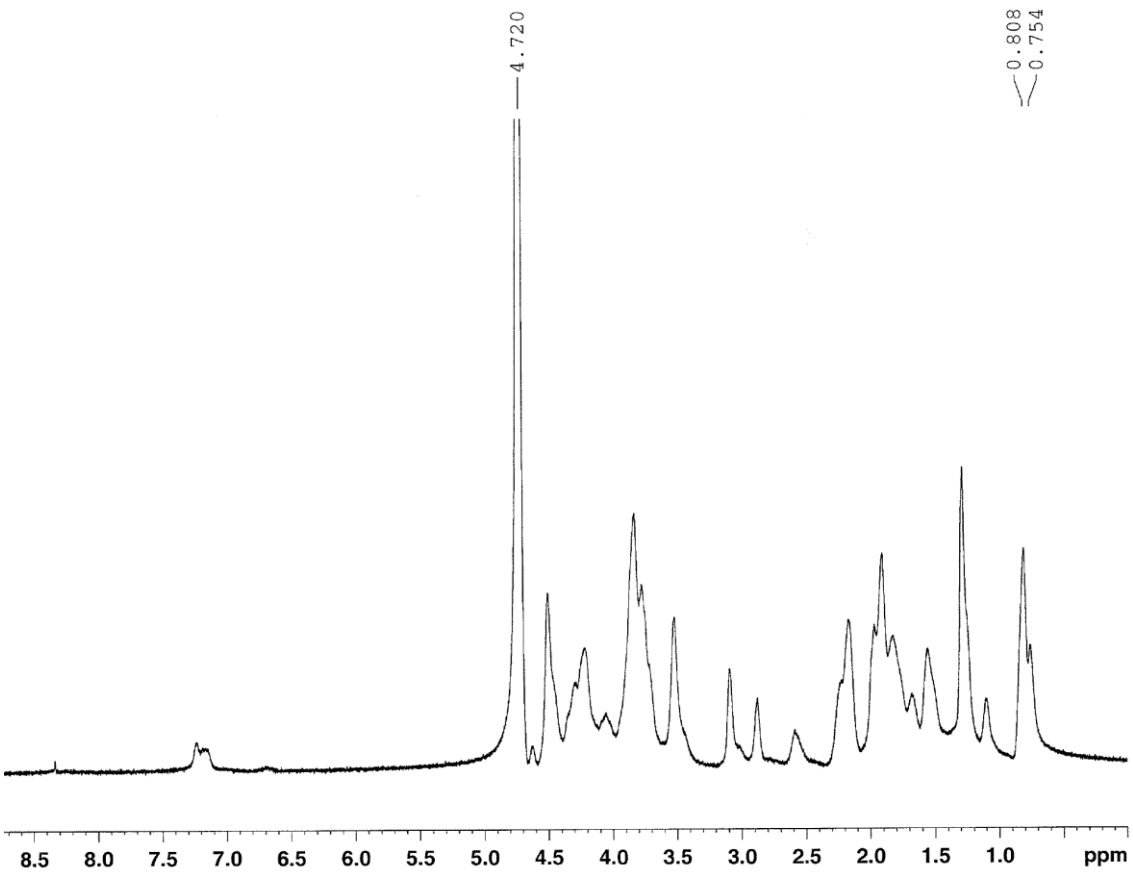

Abb. 19: ^{1}H-NMR-Spektrum von Gelatine B: Die Signale der Methacryl-Wasserstoffe bei ca. 5,3 ppm und 5,5 ppm waren hier nicht vorhanden. Bei der Substitutionsreaktion werden diese Funktionen im Molekül eingebracht und sind als zwei zusätzliche Peaks im Spektrum erkennbar. Das Signal bei ca. 0,8 ppm diente als Gelatine-Referenz und der Peak bei 4,72 ppm (Wasser) diente als interner Standard für die Quantifizierung.

GelMA-1

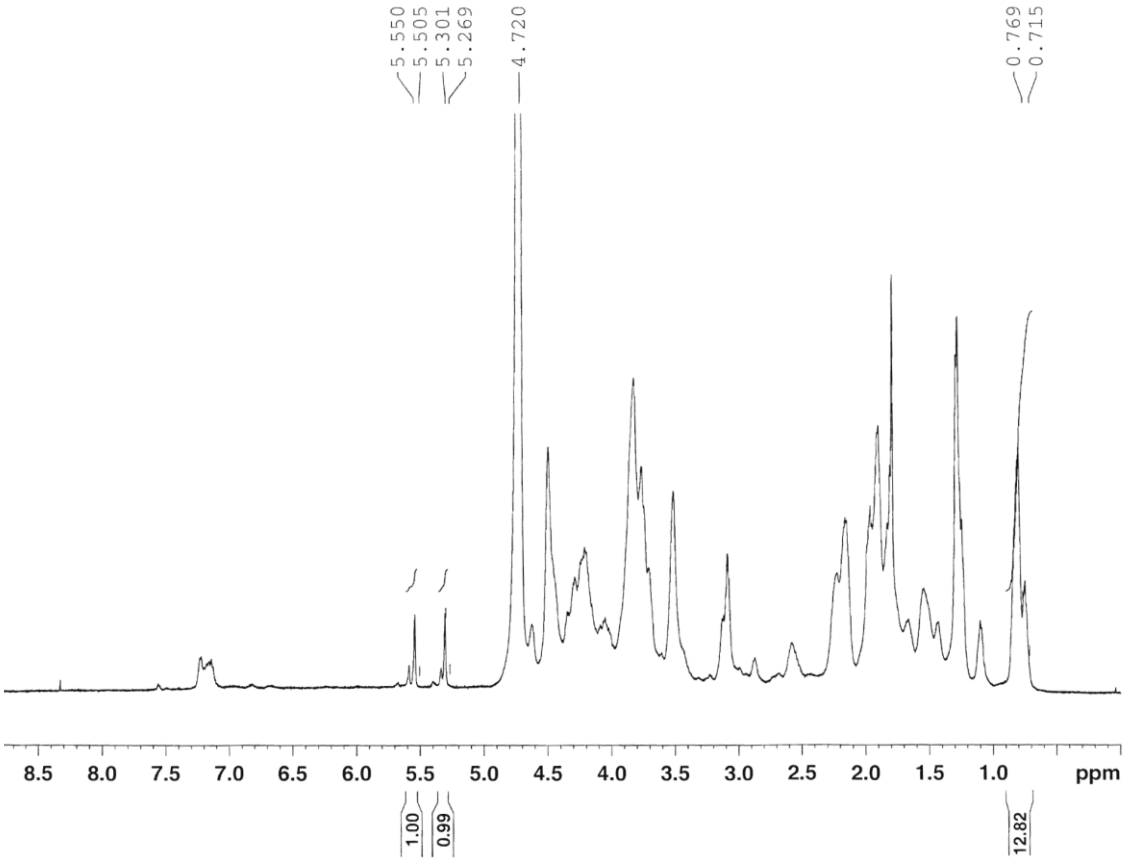

Abb. 20: ^{1}H-NMR Spektrum von GelMA-1: Die Methacryl-H-Atome waren zwischen 5,269 und 5,301 ppm beziehungsweise zwischen 5,505 und 5,550 ppm zu beobachten. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Substitutionsreaktion stattgefunden hatte.

GelMA-2

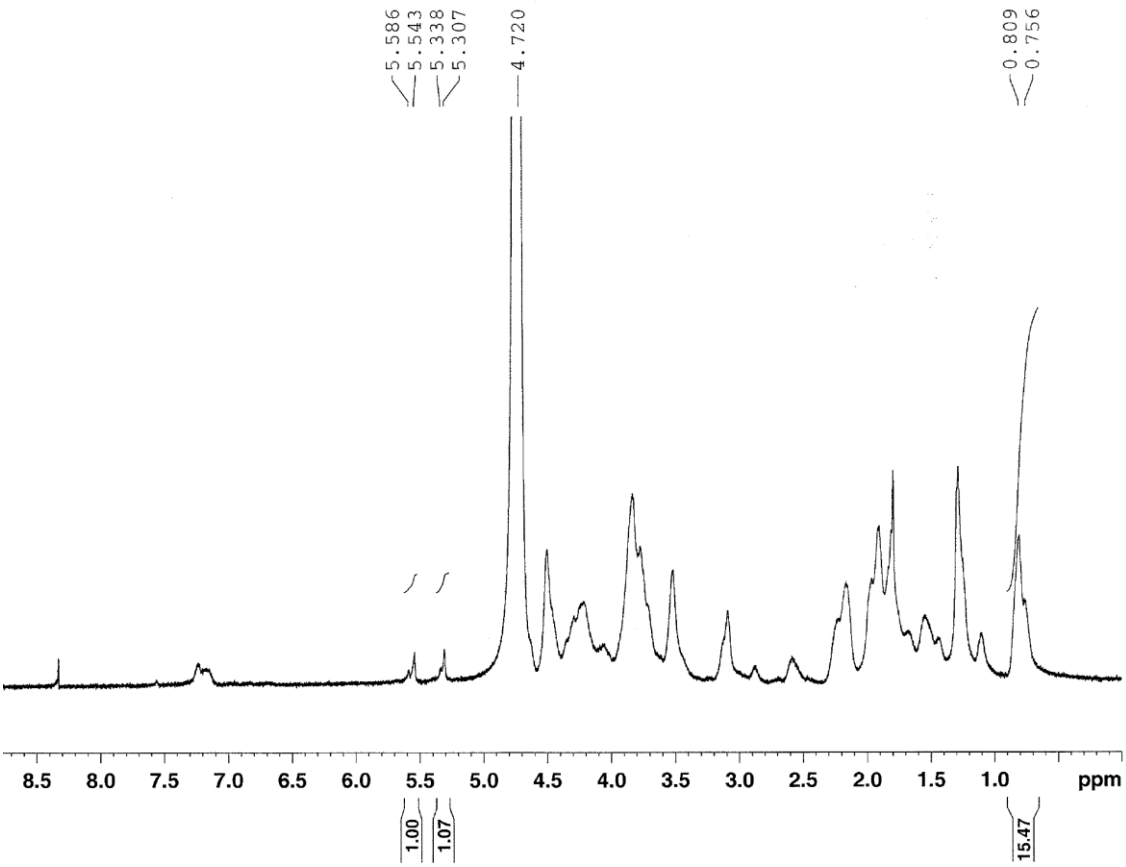

Abb. 21: ^{1}H-NMR Spektrum von GelMA-2: Die Methacryl-H-Atome gaben Signale zwischen 5,307 und 5,338 ppm und 5,543 und 5,586 ppm zu erkennen.

GelMA-3

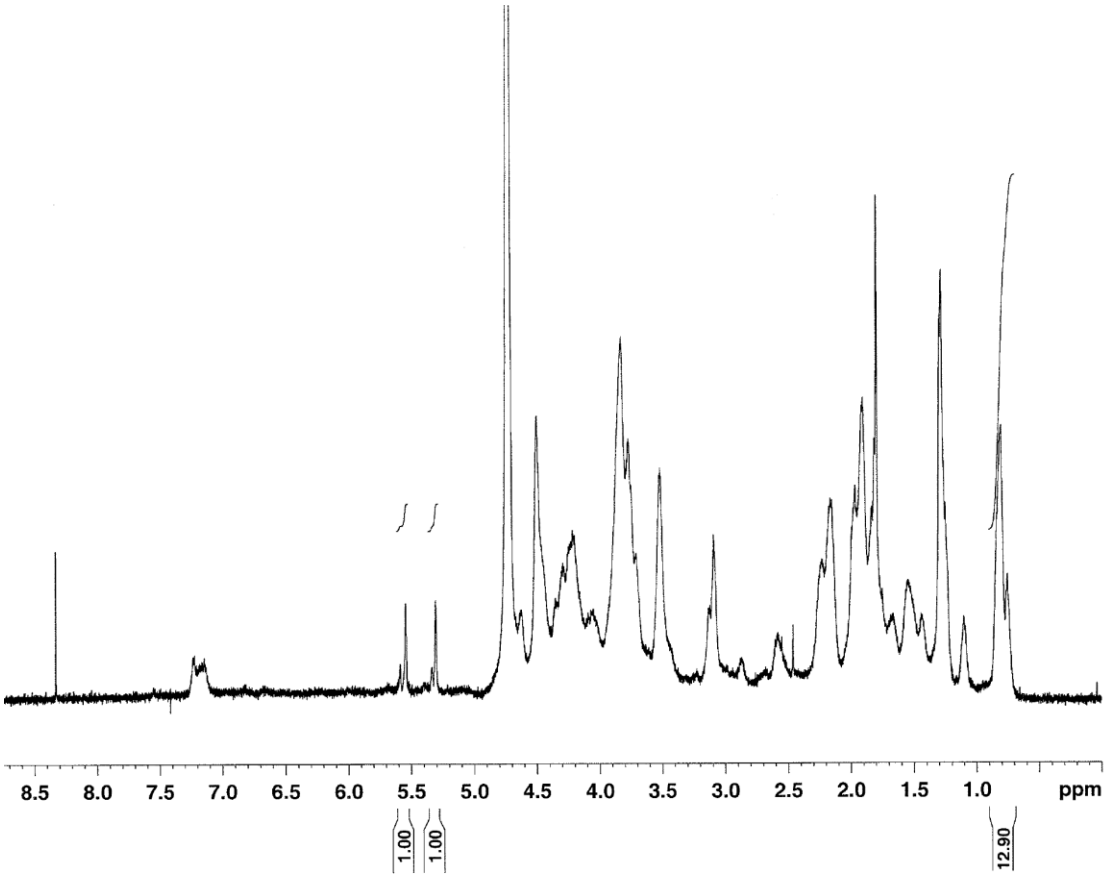

Abb. 22: ^{1}H-NMR Spektrum von GelMA-3: Die Signale für die Methacryl-H-Atome waren zwischen 5,29 und 5,38 ppm beziehungsweise zwischen 5,51 und 5,61 ppm zu erkennen.

GelMA-4

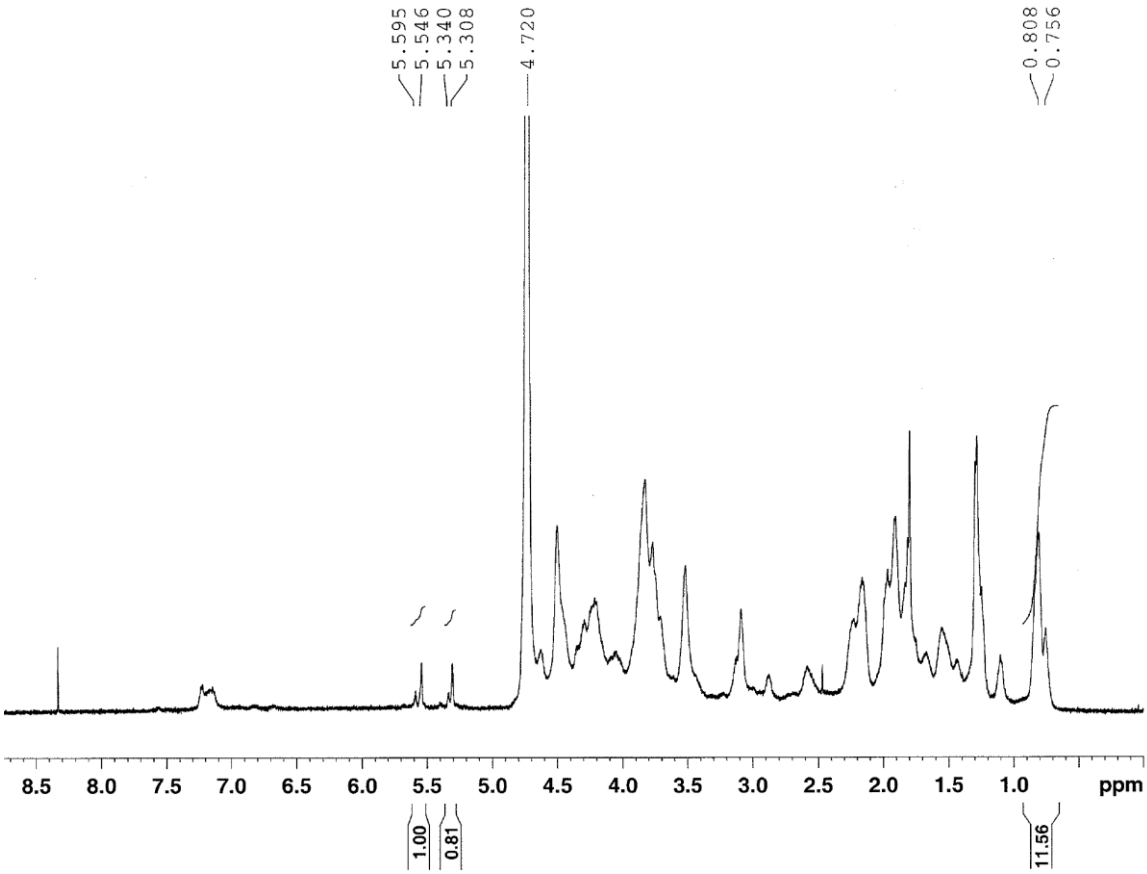

Abb. 23: ^{1}H-NMR Spektrum von GelMA-4: Die Signale zwischen 5,308 und 5,340 ppm sowie zwischen 5,546 und 5,595 ppm deuteten auf das Vorhandensein von Methacryl-Gruppen hin.

3.2 Methodenoptimierung zur UV-Photopolymerisation der GelMA

3.2.1 Methodenoptimierung zur Hydrogelherstellung

Ein wichtiger Schritt für diese Arbeit bestand in der Entwicklung einer geeigneten Methode zur Hydrogelherstellung. Zunächst musste die Polymerisationsreaktion realisiert werden, wozu die PI-Konzentration, sowie die Einstellungen der Bestrahlungsdauer verändert und optimiert wurden. Die unterschiedlichen Strategien wurden in Tabelle 11: chronologisch nach deren Durchführung aufgelistet und nach Entstehung eines Hydrogels bewertet (+ positiv, - negativ). Die Konzentration der GelMA wurde dabei als einziges konstant bei 10 % gehalten. Nach etlichen Fehlversuchen, bei denen die 10 % GelMA-Lösungen nicht zu Hydrogelen polymerisierten, konnte ein erstes positives Ergebnis bei der Deckglasbeschichtung erzielt werden. Die niedrigste PI-Konzentration, ab der eine Polymerisation zum Hydrogel erfolgen konnte, lag bei 0,6 mg/ml. Die Bestrahlungsintensität konnte mit 4 mW/cm^2 relativ gering gehalten werden und eine Bestrahlungszeit von 15 min wurde als ausreichend beobachtet. Die 10 % GelMA-Lösung mit einer PI-Konzentration von 0,6 mg/ml eignete sich auch zur Direktbeschichtung von Wells in einer 96-Wellplatte.

3.2.1.1 Herstellung der Hydrogele durch Direktbeschichtung von Wells

Hydrogele, die über Direktbeschichtung von Wells hergestellt wurden, waren gelblich gefärbt, mit einer leichten Trübung. Die Form der Hydrogele war zylinderförmig mit einem Durchmesser von 4 mm und einer Höhe von etwa 3 mm.

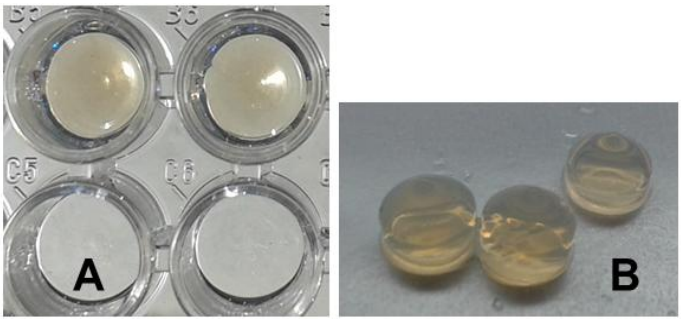

Abb. 24: Direktbeschichtung von Wells: Die Wells der oberen Plattenreihe (A) enthalten das nach der Photopolymerisation gelblich gefärbte, opaleszente Hydrogel. Es wurden runde Hydrogele (ø=4 mm, h=3 mm) (B) gewonnen.

Da ihre Oberfläche stark gewölbt war, konnten derartig geformte Hydrogele nicht zur Austestung an Zellen eingesetzt werden, weil durch die starke Krümmung Inhomogenitäten bei der Zellanhaftung auftraten. Mit dieser sehr raschen und einfachen Methode hergestellte Hydrogele dienten zur Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften durch Bestimmung von Quellungsfaktor (QF) und Gelfraktion (GF).

Konzentration		**Vol. (µl)**	**Beschichtungsart**	**UV-Bestrahlung**		**Erfolg**
GelMA	**PI**			**Dauer (min)**	**Intensität**	
10 %	0,03 mg/ml	250 µl	direkt (48 Wellplatte)	30	4 mW/cm^2	-
10 %	0,3 mg/ml	250 µl	direkt (48 Wellplatte)	30	4 mW/cm^2	-
10 %	0,6 mg/ml	250 µl	direkt (48 Wellplatte)	15	4 mW/cm^2	-
10 %	0,6 mg/ml	25 µl	Deckglas	15	4 mW/cm^2	-
10 %	0,6 mg/ml	25 µl	Deckglas	15	4 mW/cm^2	-
10 %	0,6 mg/ml	25 µl	Tropfen (alleine)	15	4 mW/cm^2	+
10 %	0,6 mg/ml	200 µl	direkt (Chamberslide)	15	4 mW/cm^2	-
Modifikationen: ➔ Konzentration an PI angehoben.						
10 %	0,12 mg/ml	25 µl	Deckglas	15	4 mW/cm^2	-
10 %	0,3 mg/ml	25 µl	Deckglas	15	4 mW/cm^2	-
10 %	0,6 mg/ml	25 µl	Deckglas	15	4 mW/cm^2	+
10 %	2 mg/ml	25 µl	Deckglas	15	4 mW/cm^2	+
10 %	0,6 mg/ml	100 µl	direkt (96 Wellplatte)	15	4 mW/cm^2	+
➔ Probleme beim Einsatz von Deckgläsern (Brechen der Gläser beim Abheben). Modifikationen: ➔ Einsatz von Gewebekultur-Deckgläsern.						
10 %	0,6 mg/ml	25 µl	Gewebekultur-Deckgläsern	15	4 mW/cm^2	+
➔ Aussaat und Kultivierung der primären OB möglich; inhomogenes Wachstum						

Tabelle 11: Strategien zur Herstellung von Hydrogelen zur Kultivierung von primären OB in chronologischer Reihenfolge der erforderlichen Modifikationen.

3.2.1.2 Hydrogelherstellung durch Deckglasbeschichtungen

Die Deckglasbeschichtungen wurden als Anhaftungsmaterial für die Kultur primärer OB eingesetzt, wobei das Augenmerk darauf gelegt wurde, ob und ab welcher Zelldichte bei der Aussaat ein konfluenter Zellrasen entstehen konnte. Jene Gruppen, die Konfluenz zeigten, wurden mit MM weiterkultiviert, um auf die Aktivität von ALP, und damit auf die Differenzierung der primären OB, zu testen. Da sich in diesen Experimenten zeigte, dass sich Deckgläser nicht als Materialien zur Beschichtung eigneten, wurde diese Methode nicht weiter verfolgt. Statt der Deckgläser kamen Gewebekultur-Deckgläser zur Anwendung.

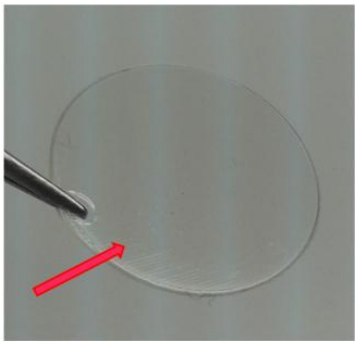

Abb. 25: Gewebekultur-Deckglas mit einer Hydrogelbeschichtung.

Ergebnisse aus den Zellkulturversuchen auf Gewebekultur-Deckglas ließen auf keine Eignung als Zellanhaftungsfläche schließen. Wegen mangelnder mechanischer Stabilität war die Ausbildung eines konfluenten Zellrasens nicht möglich und die Reproduzierbarkeit nicht gegeben. Es wurde eine andere Strategie zur Hydrogelherstellung verfolgt.

3.2.1.3 Hydrogelherstellung in Gießformen

Eine Methode der Herstellung von Hydrogelen bestand darin, 10 % GelMA-Lösungen in Gießformen zu füllen und unter Einwirkung von Irgacure 2959 und UV-Licht zu photopolymerisieren. Die verwendeten Formen entstanden im Eigenbau aus 2 Glas-Objektträgern, 4 zurechtgeschnittenen Silikon-Spacern und 2 Papierklemmen, die das Konstrukt zusammenhielten. Nach der UV-Einwirkung wurde ein etwa 1 mm dicker Hydrogelfilm gewonnen, aus dem flache, zylindrische Stücke ausgestanzt werden konnten.

Die runden Hydrogele (Ø=7 mm, h=1 mm), eigneten sich nach Optimierung der Zellaussaat und entsprechende Vorbehandlung als Material zur Kultivierung primärer OB. Bei einer PI-Konzentration von 0,6 mg/ml war die Hydrogelherstellung zwar möglich, jedoch lief die Polymerisation nicht vollständig ab, weshalb ein weniger stabiles Hydrogel entstand, das sich zur Weiterverwendung nicht eignete.

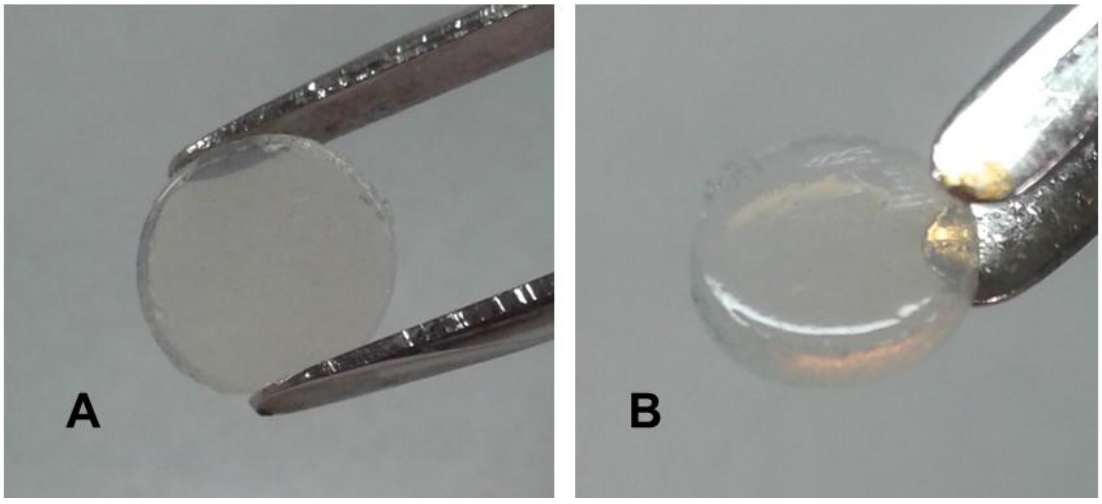

Abb. 26: Ausgestanzte Hydrogelplättchen (Ø=7 mm, h=1 mm). Diese wurden aus 10 % GelMA-Lösungen mit Zusatz von 2 mg/ml (A) oder 6 mg/ml (B) PI Irgacure 2959 hergestellt.

Konzentration		Vol. (µl)	Beschichtungsart	UV-Bestrahlung		Erfolg
GelMA	PI			Dauer (min)	Intensität	
10 %	2 mg/ml	250 µl	direkt (48 Wellplatte)	15	4 mW/cm^2	+
10 %	2 mg/ml	1,5 ml	Gießform	15	4 mW/cm^2	+
10 %	2 mg/ml	1,5 ml	Gießform (+ Parafilm)	15	4 mW/cm^2	+
10 %	2 mg/ml	1,5 ml	Gießform (+ gedehnter Parafilm)	15	4 mW/cm^2	-
10 %	2 mg/ml	1,5 ml	Gießform (+ Gelhandler)	15	4 mW/cm^2	-
10 %	1 mg/ml	1,5 ml	Gießform	15	4 mW/cm^2	+
10 %	0,6 mg/ml	1,5 ml	Gießform	15	4 mW/cm^2	+
➔ Zellversuche und Mineralisationsassay möglich.						

Tabelle 12: Optimierung der Herstellungsmethode für runde Hydrogele in chronologischer Auflistung der Optimierungsmaßnahmen.

3.2.2 Charakterisierung der Hydrogele mittels GF und QF

Als zwei Parameter zur Charakterisierung mechanischer Eigenschaften der Hydrogele wurden GF (Gelfraktion) und QF (Quellungsfaktor) bestimmt. Für 10 % GelMA-Lösungen mit einer PI-Konzentration von 2 mg/ml wurden für beide Parameter in allen Chargen sehr vergleichbare Werte erzielt. Die GF lag bei Werten zwischen 12,10 und 14,47 %, während sich der QF in einem Bereich von 591,30 bis 620,85 % bewegte. Die Ergebnisse wurden tabellarisch erfasst (Tabelle 13:) und statistisch bewertet. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den Hydrogelen aus den vier unterschiedlichen GelMA-Chargen zu beobachten (n=3). Diese Analyse wurde zur Beurteilung der Robustheit der Polymerisationmethode eingesetzt, die als gegeben angesehen werden konnte.

	Gelfraktion (GF)	**Quellungsfaktor (QF)**
GelMA-1	**14,47** ± 0,15 %	**591,30** ± 7,47 %
GelMA-2	**13,88** ± 0,40 %	**620,85** ± 20,75 %
GelMA-3	**12,10** ± 0,60 %	**675,15** ± 33,42 %
GelMA-4	**13,76** ± 0,09 %	**626,48** ± 4,98 %

Tabelle 13: Charakterisierte mechanische Parameter: Gelfraktion (GF) und Quellungsfaktor (QF) der 10 % GelMA-Hydrogele, die aus 4 unterschiedlichen Chargen hergestellt wurden mit einer PI-Konzentration von 2 mg/ml.

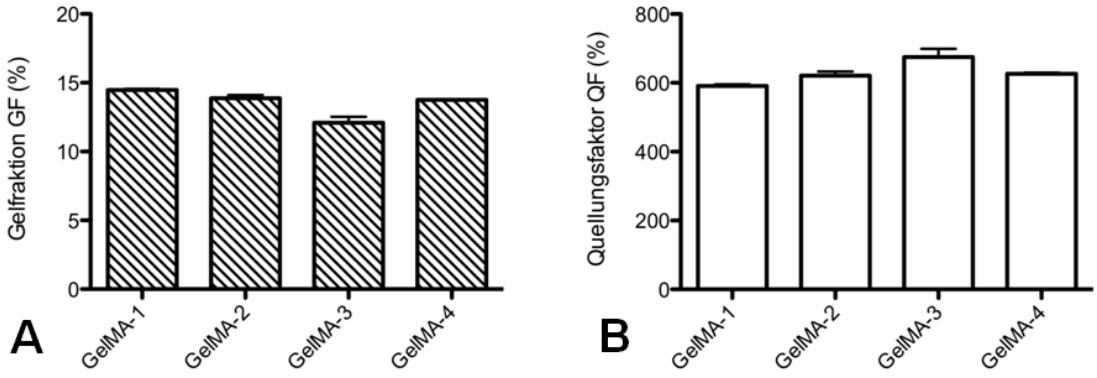

Abb. 27: Statistische Auswertung der Bestimmung der beiden mechanischen Parameter GF (A) und QF (B) für 10 % GelMA-Hydrogele nach der UV-Photopolymerisation (%; Mittelwert ± SEM; n=3).

3.3 Methodenoptimierung zur Zellaussaat auf den Hydrogelen

Um einen konfluenten Zellrasen zu erhalten, musste eine geeignete Methode zur Zellaussaat gewählt werden, welche sowohl durch Variation des Volumens an Zellsuspension, als auch durch Abänderung der Zelldichte an die gegebenen Anforderungen angepasst wurde.

3.3.1 Zellaussaat auf Deckglasbeschichtungen

Bei Aufbringung von 0,5 ml Zellsuspension auf die Deckglasbeschichtung kam es zu großen Inhomogenitäten innerhalb der Platte. Der Einsatz von Suspensionskulturplatten sollte diesen Effekt verringern, jedoch konnte durch den starken hemmenden Effekt auch auf den Hydrogelen kein Zellwachstum erfolgen.

Volumen an Zellsuspension	**Zelldichte**	**Vorinkubationszeit**	**konfluente Zellschicht**
0,5 ml	2 Mio/ Platte	0 min	-
0,5 ml	4 Mio/ Platte	0 min	-
Modifikationen: ➔ Verringerung des Volumens auf Tropfengröße.			
100 µl	1 Mio/ Platte	30 min	-
100 µl	2 Mio/ Platte	30 min	-
100 µl	4 Mio/ Platte	30 min	+, inhomogen
100 µl	8 Mio/ Platte	30 min	+
➔ Ausbildung eines konfluenten Zellrasens auf den Deckglasbeschichtungen.			

Tabelle 14: Methodenoptimierung der Aussaat von primären OB auf Deckglasbeschichtungen. Maßnahmen in chronologischer Reihenfolge mit Bewertung des Erfolges anhand Ausbildung eines konfluenten Zellrasens (+ positiv, - negativ).

Durch Verringerung des Volumens der Zellsuspension auf 100 µl und Aufbringung der Zellen in einer sehr hohen Dichte von 8 Mio Zellen pro Platte konnte eine Anhaftung an das Hydrogel und die Ausbildung eines konfluenten Zellrasens erreicht werden. Eine Zentrifugation (5 min, 25°C, 1500 Umdrehungen/min) der Platte unmittelbar nach der Aussaat hatte keinen Effekt auf das Ergebnis und wurde daher bei weiteren Versuchen nicht mehr durchgeführt.

3.3.2 Zellaussaat auf ausgestanzten Hydrogelplättchen

Da sich die Deckglasbeschichtung als ungeeignet zur Kultivierung primärer OB erwies, war ein stabileres Hydrogel erforderlich, in Form von ausgestanzten Hydrogelplättchen (Ø=7 mm, h=1 mm). Daher musste auch die Methode zur Zellaussaat dem neu eingesetzten Anhaftungsmaterial angepasst werden. Durch die Aussaat der Zellen in zwei Schritten konnte eine Anhaftung der Zellen erreicht werden, jedoch war das Problem, dass die Suspension in vielen Fällen am Hydrogel vorbei in das Well floss, nur durch eine weitere Verringerung des Volumens an Zellsuspension auf 25 µl und eine entsprechende Vorbehandlung des Materials zu beseitigen. Die Bildung einer konfluenten Zellschichte wurde als Kriterium für die Eignung der Methode eingesetzt (+ positiv, - negativ).

Volumen an Zellsuspension	**Zelldichte**	**Vorinkubation**	**konfluente Zellschichte**
50 µl	4 Mio/ Platte	30 min	-
50 µl + 450 µl	8 Mio/ Platte (4+4)	30 min	+, inhomogen
50 µl + 450 µl	4 Mio/ Platte (2+2)	30 min	+, inhomogen
Modifikationen: ➔ Verlängerung der Vorinkubationszeit. ➔ Verringerung des Volumens der Zellsuspension.			
50 µl + 450 µl	4 Mio/ Platte (2+2)	120 min	-
25 µl + 475 µl	8 Mio/ Platte (4+4)	120 min	+, inhomogen
Modifikationen: ➔ entsprechende Vorbereitung der Hydrogele.			
25 µl	8 Mio/ Platte	90 min	+
➔ Anhaftung der primären OB ans Hydrogel.			

Tabelle 15: Methodenoptimierung der Aussaat von primären OB auf Hydrogelbeschichtungen von Deckgläsern anhand der Bildung einer konfluenten Zellschichte.

Nach dreitägiger Vorinkubation der Hydrogele bei 37°C und 5 % CO_2, vollständiger Entfernung der Flüssigkeit im Well und Platzierung der Hydrogele in Wellmitte weg vom Rand, konnten die Zellen hochkonzentriert in 25 µl Suspension tropfenförmig in einer Zelldichte von $2{,}5x10^5$ Zellen/cm^2 auf das Hydrogel aufgebracht werden. Durch Inkubation für 90 min bei 37°C und 5 % CO_2 vor Zugabe des restlichen KM wurde ausreichende Anhaftung der Zellen erreicht. Eine homogene Verteilung der Zellen auf dem Material, sowie innerhalb der Platte war gegeben. Die Methode zur Zellaussaat eignete sich zur Durchführung eines Mineralisationsassays auf den Hydrogelen.

3.4 Einflüsse der Hydrogel-Komponenten auf die Zellviabilität von primären OB mittels WST-1-Assay

Bei dem WST-1-Assay wurde dem KM der PI Irgacure 2959 beziehungsweise GelMA in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt, um den jeweiligen Einfluss auf die Zellviabilität aufzuzeigen.

3.4.1 Einfluss des inaktiven und aktivierten PI Irgacure 2959 auf die Viabilität primärer OB

Die photometrische Analyse der Zellviabilität und deren statistische Beurteilung ergab keine signifikante Beeinflussung der primären OB durch den inaktiven PI Irgacure 2959 (keine UV-Bestrahlung). Hingegen war in der mit UV-Licht bestrahlten Gruppe bei 0,3 mg/ml (** $p<0,01$) und in den Gruppen 0,6 und 1 mg/ml (*** $p<0,001$) eine signifikante Reduktion der Zellviabilität zu beobachten. Die Ergebnisse können der Abb. 28 entnommen werden. Bei morphologischer Charakterisierung (Abb. 28, C und D) ist festzustellen, dass nach 48 h in der nicht mit UV-Licht bestrahlten Gruppe ein konfluenter Zellrasen gewachsen ist. In der mit UV-Strahlung behandelten Gruppe konnte sich dieser nicht entwickeln.

Konzentration Irgacure 2959	**Inaktiver PI (0 min UV) % Viabilität (Kontrolle = 100 %)**	**Aktivierter PI (10 min UV) % Viabiltät (Kontrolle = 100 %)**
Kontrolle	**100,00** ± 17,53%	**100,00** ± 12,69%
0,1 mg/ml	**96,64** ± 16,15 %	**100,07** ± 1,53 %
0,3 mg/ml	**105,55** ± 10,54 %	**60,82** ± 12,77 %
0,6 mg/ml	**111,74** ± 19,71 %	**20,49** ± 5,57 %
1 mg/ml	**89,27** ± 6,72 %	**10,10** ± 4,25 %

Tabelle 16: Ergebnisse der Zellviabilitätstests unter Einfluss des PI Irgacure 2959 mittels WST-1-Assay.

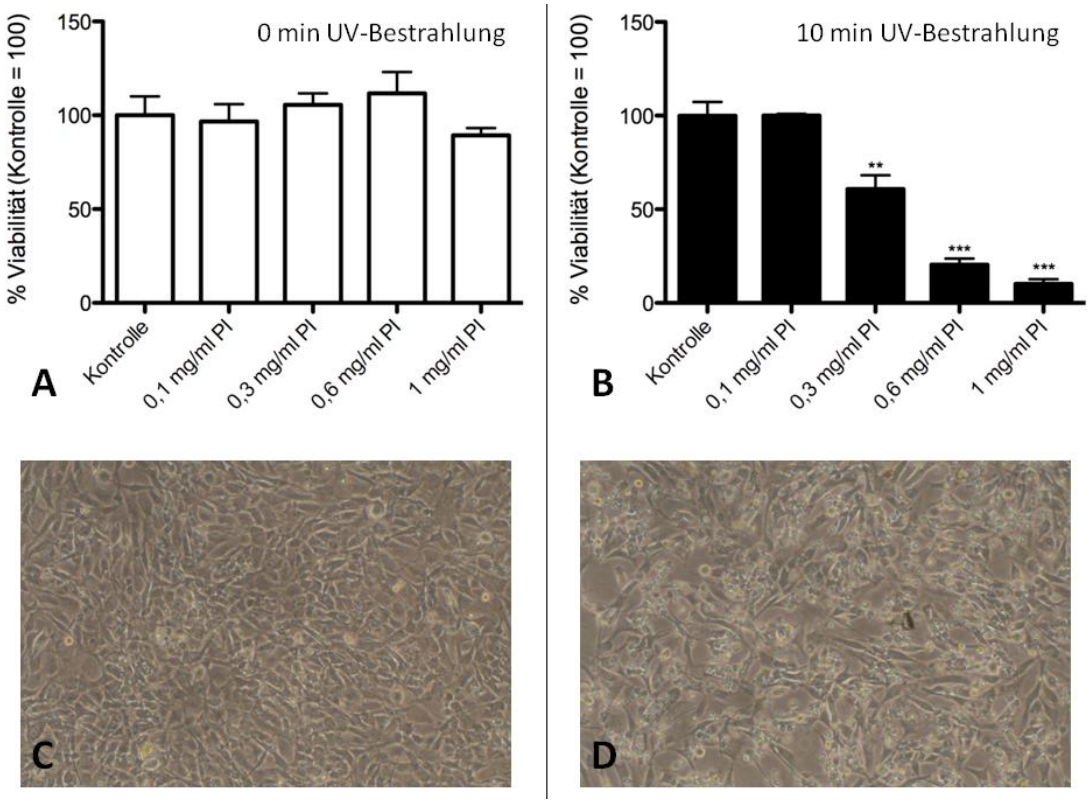

Abb. 28: Graphische Darstellung der statistischen Auswertung der Zellviabilität primärer OB, die durch Umsetzung von WST-1 (Water Soluble Tetrazolium) beurteilt wurde. Dabei wurde der PI Irgacure 2959 in unterschiedlichen Konzentrationen zum KM (10 % α-MEM) zugesetzt (0,1, 0,3, 0,6 und 1 mg/ml). Der inaktive PI (keine UV-Bestrahlung) beeinflusst die Zellviabilität nicht (A). Hingegen ist bei Aktivierung durch 10 min UV-Bestrahlung des PI eine Reduktion der Viabilität in den Konzentrationen 0,3 mg/ml (** $p<0,01$) und 0,6 und 1 mg/ml (*** $p<0,001$) zu beobachten (B). Die mikroskopischen Detailaufnahmen (10x Vergrößerung) zeigen primäre OB nach 48 h Inkubation in 0,3 mg/ml PI ohne (C) und mit (D) Aktivierung des PI durch UV-Bestrahlung. (%; Mittelwert ± SEM; n=4; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$) Kontrolle = 10 % α-MEM.

3.4.2 Einfluss von GelMA-Lösungen auf die Viabilität primärer OB

Bei der statistischen Auswertung der photometrisch ermittelten Werte (Abb. 29) zeigte sich eine signifikante Abnahme der Zellviabilität bei einer Konzentration von 2 % GelMA im KM auf primäre OB (*** p<0,001). Dies entspricht einer prozentuellen Reduktion um 21,80 %.

Konzentration GelMA in KM	**% Viabilität (Kontrolle = 100)**
Kontrolle	**100** ± 3,99 %
0,1 %	**100,61** ± 1,93 %
0,5 %	**94,37** ± 6,44 %
1 %	**90,15** ± 3,58 %
2 %	**78,20** ± 0,51 %

Tabelle 17: Ergebnisse der Zellviabilitätstest zur Abschätzung des Einflusses von GelMA.

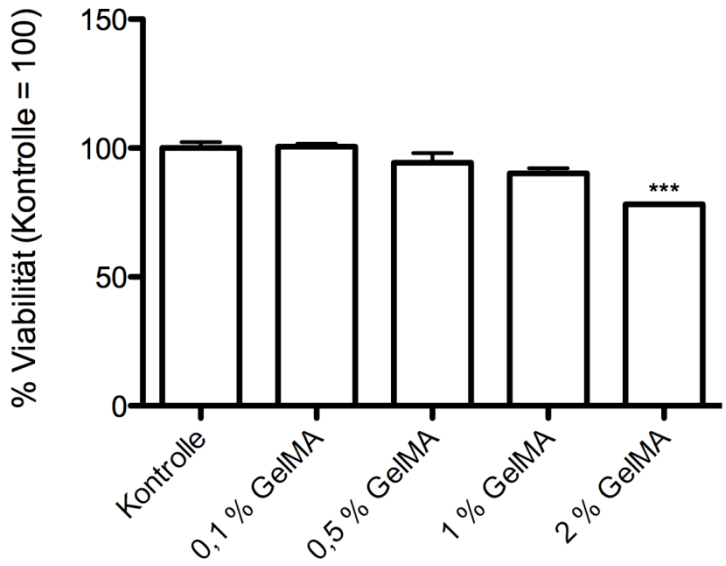

Abb. 29: Statistische Auswertung der Zellviabilität primärer OB, die durch Umsetzung von WST-1 (Water Soluble Tetrazolium) beurteilt wurde. GelMA wurde dabei in unterschiedlichen Konzentrationen zum KM zugesetzt (0,1, 0,5, 1 und 2 %). Bei 2 % GelMA ist eine Reduktion der Zellviabilität (*** p<0,001) um 21,80 % zu beobachten (%; Mittelwert ± SEM; n=4; *** p<0,001). Kontrolle = 10 % α-MEM.

3.5 *In-vitro* Austestung der Hydrogele an primären OB

3.5.1 Effekt der Deckglasbeschichtung auf die Differenzierung und Mineralisation extrazellulärer Matrix von primären OB

3.5.1.1 ALP-Aktivität von primären OB auf Deckglasbeschichtungen

Die Aktivität von ALP ist ein Indikator für das Vorliegen differenzierender OB. Die Differenzierung kann durch Kultivierung in MM, welches Vit.C (50 µg/ml) als Stimulans der Differenzierung und β-GP (10 mM) als organische Phosphatquelle enthält, angeregt werden. Es wurden 10 % GelMA-Hydrogele als Deckglasbeschichtung hergestellt. Um eine Beeinflussung durch den PI-Gehalt im Hydrogel zu untersuchen, wurden drei unterschiedliche Konzentrationen getestet (0,6, 1 und 2 mg/ml). ALP-positive Zellen wurden an drei unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 1, Tag 4 und Tag 7) mittels BCIP/NBT-Färbung (SigmaFast^{TM}) sichtbar gemacht.

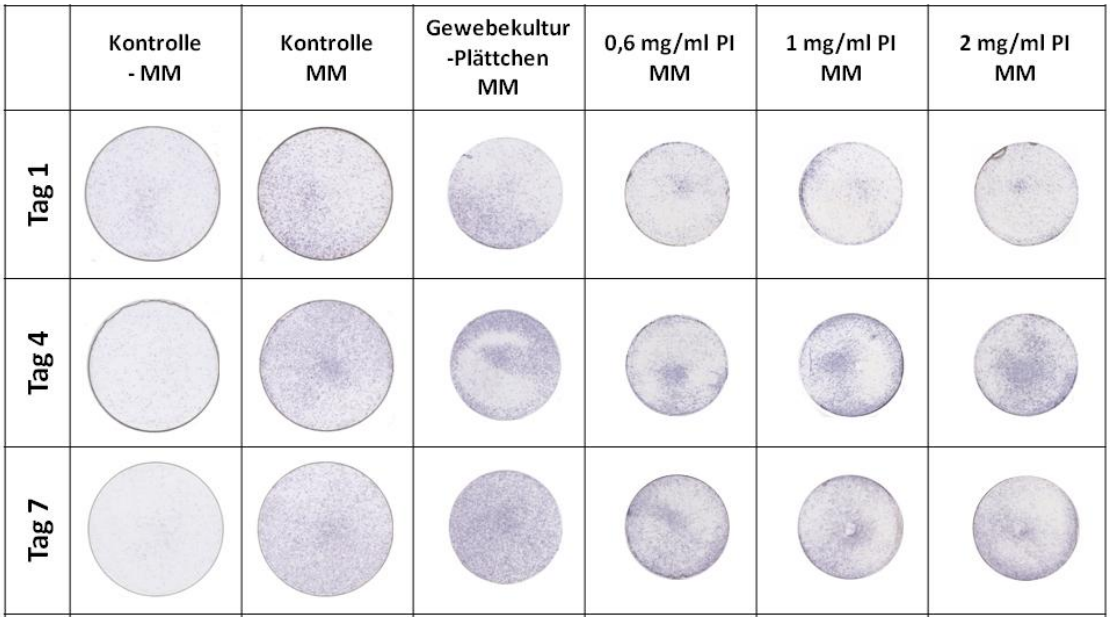

Abb. 30: Färbung der OB mit aktiver ALP an den Tagen 1, 4 und 7 auf Deckglasbeschichtungen. Die Kontrolle (-MM) wurde in KM kultiviert, alle weiteren in MM.

Es konnte gezeigt werden, dass die ALP-Aktivität zu allen drei Zeitpunkten in der Mineralisationsgruppe höher als die Kontrolle in KM war. Die Konzentration des PI hatte dabei keinen Einfluss auf das Ergebnis.

3.5.2 *Effekt der Hydrogelplättchen auf die Differenzierung und Mineralisation von primären OB*

3.5.2.1 *ALP-Aktivität primärer OB*

Aktive ALP der Zellen wurde am Tag 4 mittels BCIP/NBT-Assay gefärbt. Es konnte in allen Gruppen ein deutlicher Anstieg der ALP-Aktivität bei Kultivierung mit MM gegenüber KM gezeigt werden. Der gelbe Hintergrund stammt von der Eigenfarbe der Hydrogele. Abb. 31A zeigt Scans der Kontrollwells und der Hydrogelplättchen. Daneben werden mikroskopische Detailaufnahmen (10x Vergrößerung) von repräsentativen Ausschnitten der Zellschichte in Abb. 31B gezeigt.

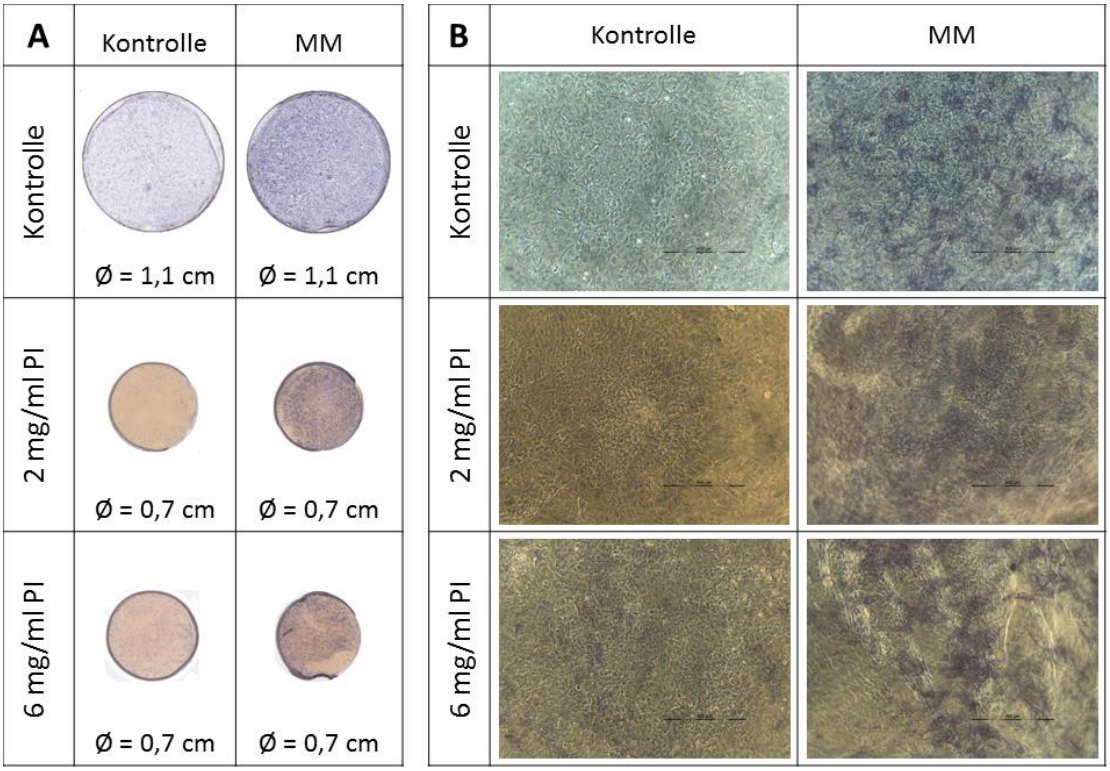

Abb. 31: Scan der Gewebekulturplatte und der Hydrogele (A) und mikroskopische Detailaufnahmen (10x Vergrößerung) von primären OB in entsprechenden Kulturen (B). Die Bilder wurden unmittelbar nach der BCIP/NBT-Färbung von ALP (blau-violette Bereiche) erstellt.

3.5.2.2 Matrixmineralisation

Ein wichtiges Kriterium, um zu beurteilen, ob aus den primären OB reife, aktive OB entstanden sind, ist deren Fähigkeit zur Mineralisation von extrazellulärer Matrix. Nach 14-tägiger Kultivierung in MM sollte herausgefunden werden, inwiefern die Hydrogele diesen Prozess beeinflussten. Mit der ALP-Färbung wurde auf das Vorliegen differenzierender OB getestet, welche im reifen Zustand die Fähigkeit zur Mineralisation besitzen. Ob sich mineralisierte Matrix gebildet hatte, wurde am Tag 14 durch einen Ca-Assay überprüft. Ab Tag 8 waren Mineralablagerungen in der MM-Gruppe sowohl mikroskopisch, als auch ohne optische Vergrößerung zu beobachten. In Abb. 32 wurde ein Scan der Platte abgebildet, bei dem die dunklen, lichtundurchlässigen Stellen die mineralisierten Bereiche der Matrix darstellen (wurden mit roten Pfeilen markiert). Bei mikroskopischer Betrachtung wurde dieses Ergebnis, wie in Abb. 33 gezeigt, bestätigt.
Auffällig ist, dass die Mineralisation vor allem am äußeren Rand des Hydrogels erfolgte, was daran liegen könnte, dass hier die Anhaftung durch nicht ganz glatte Oberflächen, die beim Ausstanzen der Gele entstanden sein könnten, begünstigt wurde.

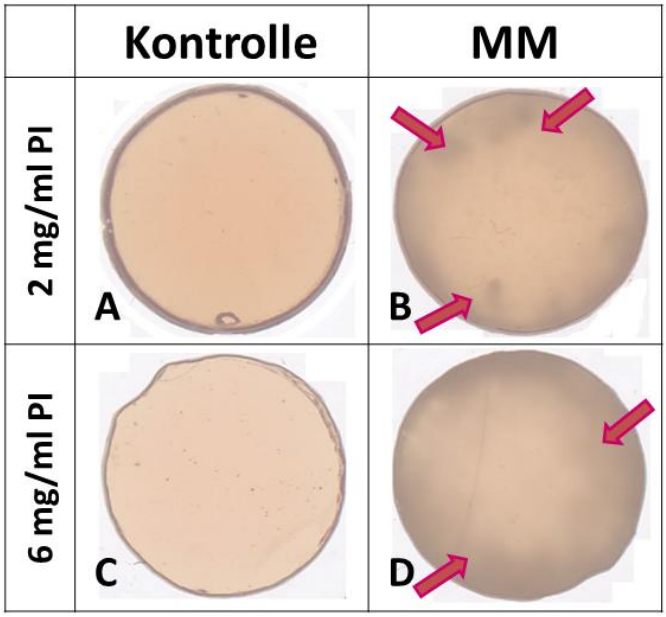

Abb. 32: Scan der Hydrogele (Ø=7 mm, h=1 mm) nach 14-tägiger Kultivierung in MM. Die Pfeile markieren Bereiche, in denen die Mineralisation besonders stark ausgeprägt war. Mineralisation war in der Gruppe mit MM in beiden PI-Konzentrationen zu beobachten (2 mg/ml (B) und 6 mg/ml (D)).

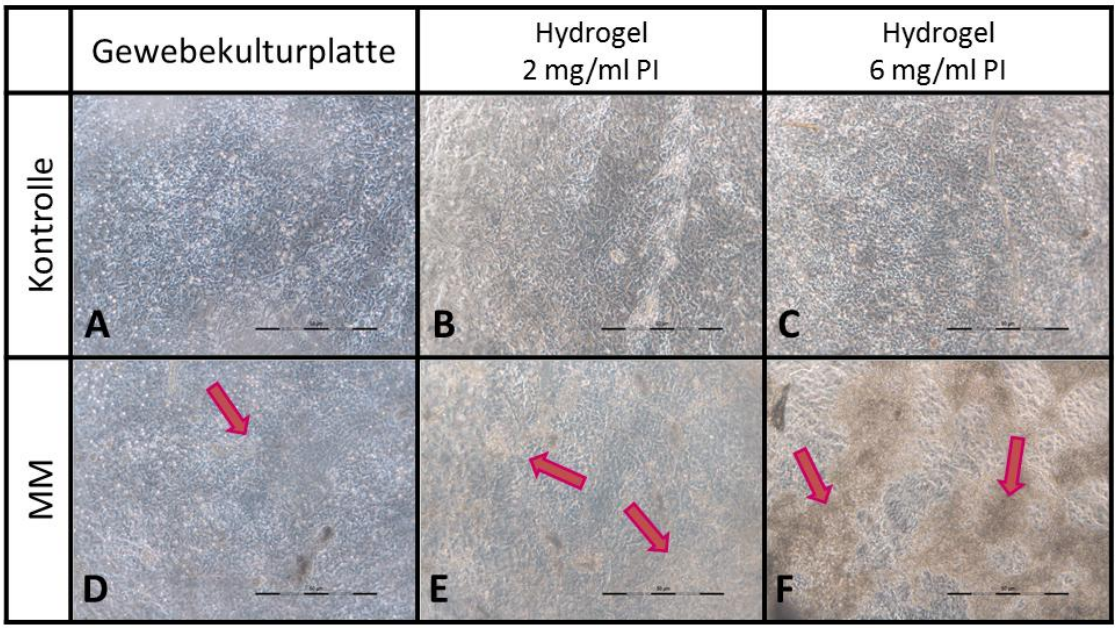

Abb. 33: Mikroskopische Detailaufnahmen (10x Vergrößerung) von primären OB nach 14-tägiger Kultivierung in MM. Rote Pfeile markieren die mineralisierten Bereiche, die in allen Gruppen zu beobachten waren, denen MM zugesetzt wurde (Gewebekulturplatte (D), 2 mg/ml PI-Hydrogel (E), 6 mg/ml PI-Hydrogel (F)). Diese ist in KM nicht entstanden (A, B, C). Gebundenes Ca wurde mit einem kolorimetrischen Ca-Assay überprüft (Maßstab = 50 µm).

Das Vorliegen von mineralisierter Matrix wurde am Tag 14 durch einen kolorimetrischen Nachweis von gebundenem Ca nach 24-stündiger Extraktion in 0,5 N Essigsäure bewiesen.

Es wurde in allen Gruppen in MM eine signifikant (*** $p<0,001$) erhöhte Ca-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne MM beobachtet. Die beiden Hydrogele (2 und 6 mg/ml PI) zeigten keine signifikante Abweichung zwischen den ermittelten Ca-Konzentrationen. Die Ausgangswerte der Kontrollgruppe auf den Hydrogelen waren im Vergleich zur Konzentration der Kontrolle in der Gewebekulturplatte erhöht, was schließen ließ, dass das Hydrogel selbst Ca enthält oder es sogar eine steigernde Wirkung auf die Mineralisation ausübt, da auch die Zellen in der Kontrollgruppe durch das Hydrogel stimuliert wurden

PI-Konzentration	Ca-Gehalt Kontrolle	Ca-Gehalt MM
Kontrolle (0 mg/ml PI)	-0,0376 ± 0,0065 mM	2,3426 ± 0,0622 mM
2 mg/ml PI	1,0182 ± 0,0587 mM	2,3891 ± 0,0424 mM
6 mg/ml PI	0,9499 ± 0,0712 mM	2,2606 ± 0,1181 mM

Tabelle 18: Ca-Gehalt (mM), der anhand einer Standardkurve mit einem kolorimetrischen Ca-Assay ermittelt wurde.

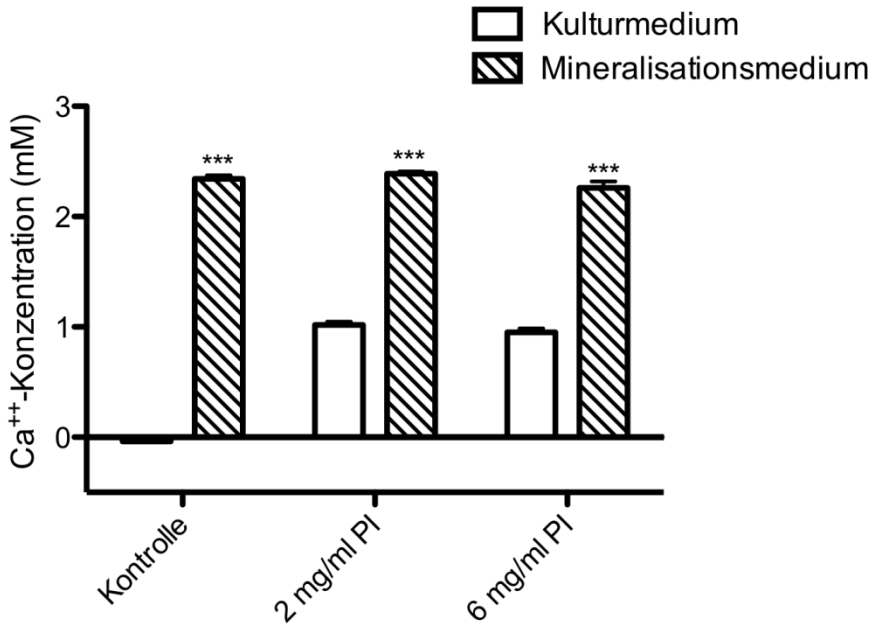

Abb. 34: Graphische Darstellung der Quantifizierung des kolorimetrisch nachgewiesenen Ca nach 14-tägiger Kultivierung primärer OB in MM auf Hydrogelen mit einer PI-Konzentration von 2 und 6 mg/ml im Vergleich zu einer Kultur in KM (mM; Mittelwert ± SEM; n=4-5; *** p<0,001) Kontrolle = Kultur auf einer 24-Well-Gewebekulturplatte.

3.5.2.3 Nachweis der Matrixmineralisation mittels Alizarin Rot S- oder Von Kossa-Färbung

Sowohl Alizarin Rot S-Färbung als auch die Von Kossa-Färbung eigneten sich nicht für den Nachweis von Matrixmineralisation auf den GelMA-Hydrogelen. Die Hydrogele wurden in beiden Fällen so stark angefärbt, dass eine Beurteilung der Ergebnisse nicht möglich war.

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

3.6.1 Synthese, Charakterisierung und Photopolymerisation von GelMA

Die Synthese der GelMA sowie deren Photopolymerisation mittels bekannter Methoden konnte realisiert werden. Die Syntheseprodukte und die daraus hergestellten Hydrogele wurden hinsichtlich ihrer mechanischen Eigenschaften charakterisiert und lieferten ähnliche Ergebnisse, was auf Robustheit der Methode schließen lässt.

GelMA	Ausbeute (pro 1g Gelatine B)	DS ^{1}H NMR	DS Habeeb Test	Gelfraktion (GF)	Quellungs-Faktor (QF)
1	0,923 g	77,61 %	79,33 ± 1,46 %	14,47 ± 0,15 %	591,30 ± 7,47 %
2	0,666 g	66,73 %	66,91 ± 2,02 %	13,88 ± 0,40 %	620,85 ± 20,75 %
3	0,668 g	77,32 %	68,71 ± 5,98 %	12,10 ± 0,60 %	675,15 ± 33,42 %
4	0,732 g	78,08 %	66,51 ± 4,59 %	13,76 ± 0,09 %	626,48 ± 4,98 %

Tabelle 19: Charakteristika der GelMA-Syntheseprodukte und der Hydrogele nach erfolgter Photopolymerisation.

3.6.2 Einflüsse der Hydrogel-Komponenten auf die Zellviabilität von primären OB mittels WST-1-Assay

Die Komponenten, aus denen das Hydrogel zusammengesetzt ist (GelMA und Irgacure 2959), wurden hinsichtlich ihrer Beeinflussung der Viabilität primärer OB mittels WST-1-Assay getestet. Es wurde eine dosisabhängige Hemmung der Viabilität sowohl bei der Austestung der GelMA, als auch des aktivierten PI beobachtet. Wird der PI nicht aktiviert, entfällt die Viabilitätshemmung.

3.6.3 Austestung der GelMA-Hydrogele in Zellversuchen an primären OB

Die primären OB konnten auf den Deckglasbeschichtungen adhärieren und bildeten konfluente Zellschichten aus. Durch die Bestimmung der Aktivität von ALP mittels Färbemethode konnte das Vorliegen differenzierender OB in der Versuchsgruppe nachgewiesen werden. Weder die Konzentration des PI (0,6, 1 und 2 mg/ml) noch der Zeitpunkt der Färbung (Tag 1, 4 und 7) beeinflussten die ALP-Aktivität.

Die Mineralisationsfähigkeit der primären OB konnte auf den dünnen Deckglasbeschichtungen wegen mangelnder mechanischer Stabilität nicht beurteilt werden. Durch Optimierung der Methode der Hydrogelherstellung und der Zellaussaat auf den stabileren Hydrogelplättchen war die Durchführung eines Mineralisationsassays mit primären OB möglich. Der Vergleich der beiden Hydrogele in unterschiedlicher Konzentration an PI (2 und 6 mg/ml) zeigte keinen Unterschied in Bezug auf Differenzierung und Mineralisation der primären OB. Aktive ALP wurde in allen mit MM behandelten Gruppen nachgewiesen, wobei die Intensität der Färbung in beiden Hydrogelgruppen gleich stark war. Der Nachweis mineralisierter Matrix erfolgte indirekt über einen Ca-Assay. Auch hier war kein Unterschied zwischen den Hydrogelgruppen zu erkennen. Auffällig war eine erhöhte Ca-Konzentration in der Kontrollegruppe auf Hydrogelen. Diese lässt auf eine osteokonduktive und osteoinduktive Wirkung des Hydrogels schließen, da es durch das Biomaterial zu einer Stimulation der Differenzierung der OB gekommen sein könnte, die hierauf zur Bildung mineralisierter Matrix befähigt waren. Eine alternative denkbare Erklärung für die erhöhte Ca-Konzentration wären Einlagerungen in Form von Hydroxyapaptit in das Hydrogel.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde ein Polymerisationsverfahren zur Herstellung eines Hydrogels auf Gelatinebasis entwickelt, mit dem Ziel, es als mögliches Knochenersatzmaterial einzusetzen. Das neue Biomaterial sollte der natürlichen Beschaffenheit extrazellulärer Matrix möglichst nahe kommen (Xiao, et al. 2011). Die Einführung reaktiver Methacryl-Gruppen an Gelatine B sowie deren UV-Polymerisation zu einem permanenten Hydrogel unter Zusatz des PI Irgacure 2959 wurde anhand bekannter Methoden realisiert (Nichol, et al. 2010), (Mironi-Harpaz, et al. 2012). Die optimierte Herstellungsmethode lieferte ein Biomaterial, welches sich zur Kultivierung von primären OB eignete, deren Proliferation, Differenzierung und Mineralisation durch das Hydrogel nicht beeinträchtigt wurden. Die fehlende Hemmung des Knochenwachstums ist laut Literatur eine Grundvoraussetzung für die Eignung als Knochentransplantat (Shrivats, et al. 2014). Das GelMA-Hydrogel entsprach dieser Anforderung und kann daher als Transplantatmaterial eingesetzt werden.

Für die Polymerisation wurden ausschließlich 10 % GelMA-Lösungen eingesetzt. Diese waren gut zu verarbeiten und die Hydrogele, welche daraus hergestellt wurden, konnten zur weiteren Austestung an Zellen eingesetzt werden. In vergleichbaren Studien konnte eine Hydrogelbildung auch in GelMA-Konzentrationen von 6 und 9 % (Jung and Oh 2014), sowie in 5, 10 und 15 % (Nichol, et al. 2010) beobachtet werden. Das in dieser Diplomarbeit verwendete Hydrogel liegt damit in einer vergleichbaren Konzentration.

Die erforderliche Konzentration an PI wurde hinsichtlich der Hydrogelbildung analysiert. Es wurde Irgacure 2959 eingesetzt, ein gut charakterisierter und wegen seiner relativ geringen Zytotoxizität häufig eingesetzter PI (Jung and Oh 2014), (Nichol, et al. 2010), (Van Den Bulcke, et al. 2000), (Mironi-Harpaz, et al. 2012). Wieviel Zusatz an Irgacure 2959 erforderlich war, richtete sich nach der Anzahl der polymerisationsaktiven Methacryl-Gruppen am GelMA-Molekül und der Energie der Anregungsstrahlung. Idealerweise sollte genau so viel PI zur Lösung zugegeben werden, dass keine durch UV-Licht aktivierten PI-Moleküle im Hydrogel zurückbleiben, während die Polymerisation dabei aber vollständig ablaufen sollte. Schäden an den Zellen können durch möglichst geringe Intensität und Dauer der UV-Bestrahlung vermieden werden.

In eigenen Versuchen wurde beobachtet, dass zur Hydrogelbildung eine PI-Konzentration von mindestens 0,6 mg/ml erforderlich war. Grund dafür dürfte die relativ geringe Strahlungsintensität von 4 mW/cm^2 (365 nm) der eingesetzten Lichtquelle sein. Die sehr lange Bestrahlungsdauer von 15 min wurde gewählt, um sicherzugehen, dass der PI vollständig aktiviert wurde. Van den Bulcke arbeitete mit einer niedrigeren PI-Konzentration von 0,4 mg/ml, jedoch war die Strahlungsintensität mit 10 mW/cm^2 (365 nm) deutlich höher. Nichol wählte eine hohe PI-Konzentration von 5 mg/ml, weshalb eine UV-Bestrahlung bei 6,9 mW/cm^2 (360-480 nm) für 1 min ausreichend war. Für zukünftige Versuche, in denen Zellen bereits während der Polymerisation im Hydrogel enthalten sind, sollte versucht werden, die Zeit der Bestrahlung zu verringern, um keine Zellschädigung durch UV-Licht herbeizuführen.

Die Materialuntersuchungen wurden mit einer Analyse des jeweiligen Einflusses der einzelnen Komponenten des Hydrogels vor der Polymerisation auf die Viabilität primärer OB abgeschlossen. Dazu wurde die Umsetzung eines wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes (WST-1) durch lebende Zellen in einem Assay nach 48 h Inkubation beobachtet. Die durchgeführten Analysen stellen zwei Extremfälle dar: Während einer Polymerisationsreaktion würde der PI mit der GelMA anstelle der Zellen interagieren, weshalb ein deutlich geringerer Effekt auf die Zellviabilität zu erwarten ist (Williams, et al. 2005).

Bei der Austestung des Einflusses des PI Irgacure 2959 auf die Zellviabilität konnte gezeigt werden, dass die zytotoxische Wirkung des PI erst mit dessen Aktivierung durch 10 min UV-Einstrahlung zustande kam. Alle getesteten Konzentrationen an PI zeigten im inaktiven Zustand keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Die Aktivierung des PI durch UV-Licht resultierte in einer signifikanten Hemmung der Viabilität der OB. Diese Ergebnisse decken sich mit vergleichbaren Studien in der Literatur (Williams, et al. 2005). Der zytotoxische Effekt des PI dürfte in dessen hydrophober Struktur liegen, wodurch die Phospholipid-Doppelschichten der Zellmembranen angegriffen werden (Fujisawa, et al. 2002). Die freien Radikale, die nach Aktivierung gebildet werden, üben ebenfalls einen zytotoxischen Effekt an den Zellen aus, da diese mit den Phospholipiden interagieren, Lipide peroxidieren und somit Proteine und DNA schädigen (Williams, et al. 2005).

Für die Abschätzung der Beeinflussung der Zellviabilität durch GelMA auf primäre OB via WST-1-Assay konnte eine reduzierte Zellviabilität nur in der hohen GelMA-Konzentration von 2 % beobachtet werden, welche vermutlich durch die sehr reaktiven Methacryl-Funktionen zustande kam.

Viabilitäts-Untersuchungen alleine reichen zur Beurteilung der Biokompatibilität eines Biomaterials allerdings nicht aus (Gomes, et al. 2001), weswegen *in-vitro* Experimente zur Charakterisierung des Biomaterials durchgeführt wurden. Um die für die Osseointegration und Osteokonduktion erforderliche Zelladhäsion und das gutes Ansprechen der Zellen (Sun, et al. 2006) nachzuweisen, wurde das Hydrogel *in-vitro* in einer 2D-Kultur an primären OB ausgetestet. Dazu musste die Methode der Zellaussaat optimiert werden, wobei vor allem auf die Anhaftung und Proliferation der Zellen geachtet werden musste. Wichtigste Parameter für erfolgreiche Aussaat auf den Hydrogelen waren zum einen die Zelldichte und das Volumen der aufgebrachten Zellsuspension und zum anderen das Zeitintervall zwischen Aussaat und Zusatz des KM (Wiedmann-Al-Ahmad, et al. 2002). Das Problem, dass die Suspension am Hydrogel vorbei in den Wellboden abrann, wurde von Wiedmann-Al-Ahmad ebenfalls beschrieben, der mit einem Volumen von 100 µl arbeitete. In eigenen Versuchen musste eine weitere Reduktion des Volumens auf 25 µl vorgenommen werden und die Hydrogele entsprechend vorbehandelt werden.

Die Zelldichte bei der Aussaat hat einen starken Einfluss auf die Anhaftung und Proliferation der Zellen (Wiedmann-Al-Ahmad, et al. 2002), (Shin, et al. 2004). Es konnte beobachtet werden, dass eine Zelldichte von $0{,}85 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 das beste Wachstum der primären OB bedingte. Diese deckt sich auch mit der empfohlenen Dichte von 1×10^4 Zellen pro cm^2 (angegeben als 1×10^5 Zellen/ml) durch Al-Ahmad. Es zeigte sich, dass das Zeitintervall von 1,5 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO_2 zur erfolgreichen Anhaftung der primären OB ans Hydrogel keinesfalls unterschritten werden durfte. Al-Ahmad wählte ein noch längeres Intervall von 2 h. Die Vorinkubation der Hydrogele für 2 Tage bei 37°C und 5 % CO_2 war eine weitere erforderliche Ergänzung zur Schaffung optimaler Bedingungen für die Zellaussaat.
Trotz erfolgreicher Anhaftung der Zellen nach deren Aussaat auf den Deckglasbeschichtungen eignete sich diese Hydrogelform nicht für eine

Charakterisierung des Zellwachstums der primären OB, da das Hydrogel aufgrund starker plastischer Verformung über zu geringe mechanische Stabilität verfügte.
Die Quellung von Hydrogelen erfolgt aufgrund ihres großen Wasseraufnahmevermögens. Das GelMA-Molekül ist flexibel und seine netzartige Struktur dehnt sich stark aus, wenn es Wasser absorbiert, was sich auch in einem sehr hohen Quellungsgrad und einer niedriger Gelfraktion widerspiegelt (Zuo, et al. 2015). Dass enzymatischer Abbau von photopolymerisierter Gelatine möglich ist (Ovsianikov, et al. 2011), zeichnet GelMA-Hydrogele zwar als geeignete Knochenersatzmaterialien aus, könnte hier aber zu Instabilitäten geführt haben. Durch die sehr geringe Dicke der Hydrogelbeschichtung waren die Einflussfaktoren stärker ausgeprägt und eine Kultivierung der OB nicht möglich. An manchen Stellen konnte ein Einreißen des Zellrasens mikroskopisch beobachtet werden und die entstandene Lücke konnte nicht mehr zuwachsen. Dies hatte eine massive Beeinträchtigung des Zellwachstums zur Folge, weshalb eine andere Herstellungsmethode für die GelMA-Hydrogele gewählt werden musste. Um die mechanische Stabilität zu erhöhen, könnte man beispielsweise GelMA mit Hydroxyapatit in einem Kompositen-Material kombinieren (Zuo, et al. 2015) oder die Zahl der Quervernetzungen durch einen höheren Substitutionsgrad der GelMA oder einer höheren Konzentration der GelMA im Hydrogel anheben (Van Den Bulcke, et al. 2000). Ebenso erfolgreich zeigte sich der Versuch, die Schichtdicke des Hydrogels zu vergrößern und dadurch für ausreichend Festigkeit zu sorgen.

Auf den stabileren Hydrogelen konnte eine Kultivierung der primären OB stattfinden. In einem Mineralisationsassay wurde der Einfluss des Biomaterials auf Differenzierung und Mineralisationsfähigkeit der OB analysiert. Dazu wurde der Versuchsgruppe MM zugesetzt (50 µg/ml Vit.C und 10 mM β-GP). Der Effekt des Hydrogels auf die Differenzierung wurde mittels Bestimmung der ALP-Aktivität überprüft, welche ein guter Marker für Knochenbildung ist (Xing, et al. 2013). Da in allen mit MM behandelten Gruppen eine intensive Färbung zu beobachten war, konnte auf das Vorliegen von differenzierenden und zur Mineralisation befähigten OB geschlossen werden (Clarke 2008). Dabei war der Einfluss des PI nicht von dessen Konzentration abhängig. In beiden getesteten Hydrogelen (2 und 6 mg/ml PI) konnte die Differenzierung der OB durch MM gleich stark angeregt werden. Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei dem Nachweis der Matrixmineralisation erzielt werden. Es sollte angemerkt werden, dass standardmäßig für primäre OB eine β-GP-Konzentration von 5 mM eingesetzt wird. Die verwendete Konzentration

von 10 mM liegt darüber, wobei es trotzdem zur Differenzierung sowie zur Einlagerung von Matrixmineralisation gekommen ist. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass eine Entwicklung zu ausdifferenzierten, mineralisierenden OB stattgefunden hatte und keine negative Beeinflussung durch das Biomaterial eingetreten ist. Die Ergebnisse des Ca-Assays lassen sogar auf eine mögliche stimulierende Wirkung des Hydrogels auf den Differenzierungs- und Mineralisationsprozess schließen, da bei dem Nachweis des extrahierten Ca nicht nur die mit MM behandelten Gruppen eine höhere Konzentration als die Kontrolle auf der Gewebekultur aufwiesen, sondern auch die Kontrolle auf den Hydrogelen einen erhöhten Ca-Gehalt besaß. Für diese Beteiligung des Biomaterials an der Färbung sind zwei Mechanismen denkbar: Es könnte (1) Ca in Form von Hydroxyapatit im Hydrogel eingeschlossen oder aber (2) die Mineralisation der OB stimuliert worden sein.

Zuo arbeitete mit einer GelMA-Präparation, die mit Hydroxyapatit verbunden wurde. Dabei wurde der Mineralisationsprozess künstlich herbeigeführt. In natürlicher Knochenmatrix wird dieser durch molekulare Einheiten des Kollagens unterstützt, welche die chemische Bindung zwischen Ca und Phosphat zu Hydroxyapatit induziert. Diese molekularen Charakteristika dürften sowohl im Hydrolyseprodukt des Kollagens, Gelatine, als auch in der GelMA vorhanden sein (Zuo, et al. 2015). Daher würden zunächst die spezielle Funktionen der GelMA, wie die Carboxyl-Gruppen, mit den freien Ca-Ionen in der Umgebung in Konjugation treten. Dabei wird die Reaktion von Phosphat-Radikalen mit Ca und damit die Bildung von Hydroxyapatit induziert (Zuo, et al. 2015), wodurch es zu Einschlüssen des Minerals in das GelMA-Hydrogel kommt. Diese Einschlüsse von Ca in Form von Hydroxyapatit im GelMA-Hydrogel könnten den Grund für die erhöhte Ca-Konzentration darstellen.

Zusätzlich wurde von Moursi eine steigernde Wirkung von Hydroxyapatit auf die Mineralisation von OB festgestellt (Moursi, et al. 2002). Die Induktion der osteogenen Differenzierung von OB wurde von Kang, der mit mineralisierten GelMA-Membranen als Knochenersatzmaterial arbeitete, bestätigt (Kang, et al. 2014). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass der beobachtete Effekt des GelMA-Hydrogels auf die Ca-Konzentration auf einer Kombination dieser beiden Mechanismen basiert, bei dem die Ca-Einlagerungen eine steigernde Wirkung auf die weitere Mineralisation ausüben.

Zusammengefasst konnte ein Biomaterial hergestellt werden, welches ausreichend an die natürliche extrazelluläre Knochenmatrix angepasst wurde, sodass die Kultivierung von primären OB möglich war. Die Reifung der OB konnte durch das Vorliegen von Matrixmineralisation bestätigt werden und ein stimulierender Effekt des Hydrogels auf den Differenzierungsprozess ist möglich. Wichtige Kriterien, wie Osteokonduktivität und Osteoinduktivität wurden hinreichend von dem Biomaterial erfüllt und zeichnen das Hydrogel als mögliches Knochenersatzmaterial aus.

Es gibt unterschiedliche Ansätze, diese Wirkung noch zu verstärken. Beispielsweise könnte man Stimulanzien der Ossifikation, wie Wachstumsfaktoren oder Hormone zusetzen. Ein Beispiel hierfür wäre die Integration von BMP-2 und PDGF in das Biomaterial (Shah 2014). Auch die Kombination von GelMA mit Hydroxyapatit liefert sehr gute Ergebnisse in der Austestung an Knochenzellen (Moursi, et al. 2002), (Kang, et al. 2014), (Zuo, et al. 2015). Da das Ziel die Herstellung eines optimalen Knochenersatzmaterials ist, sollten in zukünftigen Experimenten die fördernden Effekte auf die Differenzierung und die Mineralisation ausgenutzt und in die Versuchsplanung eingeschlossen werden. Der Fokus sollte sich dabei auch auf die Austestung des Materials an knochenresorbierenden Osteoklasten richten, um die zellulären Vorgänge bei der Knochenbildung vollständig abzudecken. Da dieses Biomaterial sich auch als Grundlage für eine 3D-Zellkultur im Sinne des „Bioprintings“ eignet, können auch Versuche zur Verkapselung von Knochenzellen durchgeführt werden.

5 Abstract

Hydrogels are biomaterials of very high importance in the field of “Bone Tissue Engineering”. They have a high potential in the treatment of critical size bone defects, which cannot heal by themselves and often come along with a lot of complications and pain for the patients.

In this diploma thesis a manufacturing process for a GelMA based hydrogel has been developed. GelMA was synthesized, structurally analyzed and crosslinked via UV-photopolymerization with Irgacure 2959 as the PI. The mechanical properties of the hydrogels were characterized by its swelling behaviour. The influence of the different hydrogel components to the cell viability of primary OB was analyzed via WST-1-assays. To see if the polymerized hydrogels could be used as bone substitute materials, their influence on the differentiation and mineralization of primary OB was tested. After the seeding method was optimized, the differentiation was analyzed in a mineralization assay, where the differentiation was stimulated by the addition of MM. ALP activity was analyzed to check if the OB were differentiating. Their ability to build mineralized matrix was tested via a Ca-Assay.

Synthesis, characterization and UV-Photocrosslinking of GelMA were performed. The effect on the viability of OB by components of the hydrogel (GelMA, PI Irgacure 2959), was analyzed using the WST-1-assay. A decrease of the viability could be observed in high concentrations.

The hydrogels were used to culture primary OB. Increased levels of ALP after stimulating their differentation with mineralization medium could be observed on all tested hydrogels. Different concentrations of PI in the hydrogel did not affect the results. Measurement of Ca showed that the mineralization was increased in both tested hydrogels (2 and 6 mg/ml PI) by the same extent.

Taken together, a biomaterial could be fabricated, with the ability to support the differentiation and mineralization of osteoblasts *in vitro*.

6 Abstract (deutsch)

Hydrogele stellen wichtige Biomaterialien im Bereich des „Bone Tissue Engineering“ dar, die besonders für die Therapie von selbstständig nicht heilenden Knochenschäden („critical size defects“) gute Einsatzmöglichkeiten bieten.

In dieser Arbeit wurde ein Hydrogel auf Basis von GelMA hergestellt. Dazu wurde GelMA synthetisiert, strukturell analysiert und unter Einsatz des PI Irgacure 2959 zu einem Hydrogel photopolymerisiert. Die mechanischen Eigenschaften wurden anhand des Quellungsverhaltens des Hydrogels charakterisiert und Einflüsse der einzelnen Hydrogel-Komponenten auf die Viabilität primärer OB wurden mittels WST-1-Assays analysiert. Die polymerisierten Hydrogele wurden auf die Eignung als Knochenersatzmaterial anhand der Differenzierung und Mineralisationsfähigkeit von primären OB ausgetestet. Nach erfolgter Optimierung der Zellaussaat auf den Hydrogelen wurde die Differenzierung der primären OB durch Zusatz von MM (Vit.C 50 µg/ml und β-GP 10 mM) angeregt. Es wurde auf die Aktivität von ALP getestet, um das Vorliegen von differenzierenden OB zu überprüfen. Ob die OB mineralisierte Matrix bildeten, wurde durch einen Nachweis des extrahierten Ca bestätigt.

Die Synthese, Charakterisierung und UV-Photopolymerisation der GelMA konnte realisiert werden. Der Einfluss auf die Viabilität primärer OB durch die einzelnen Komponenten des Hydrogels (GelMA, PI Irgacure 2959), wurden durch WST-1-Assays analysiert, wobei in den höheren getesteten Konzentrationen eine hemmende Wirkung beobachtet wurde. Die Hydrogele eigneten sich zur Kultivierung von primären OB. Die Aktivität der ALP war in allen mit MM kultivierten Gruppen nachzuweisen, wobei die PI-Konzentrationen im Hydrogel keinen Unterschied auf die Differenzierung oder Mineralisationsfähigkeit bewirkte. Die Matrixmineralisation auf ausgestanzten Hydrogelplättchen war sehr stark ausgeprägt und konnte kolorimetrisch mittels eines Ca-Assays nachgewiesen werden.

Zusammenfassend gesagt konnte ein Biomaterial hergestellt werden, welches *in-vitro* die Differenzierung und Mineralisation von OB unterstützt.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Knochenzellen.....13

Abb. 2: Signalwege bei der Reifung der OC.....17

Abb. 3: Schematischer Versuchsaufbau der praktischen Arbeit.....24

Abb. 4: Reaktionsschema bei der Hydrogelherstellung.....25

Abb. 5: Reaktionsschema der Farbstoffbildung beim Habeeb-Test.....29

Abb. 6: Chemische Struktur des PI Irgacure 2959.....31

Abb. 7: Deckglasbeschichtung.....32

Abb. 8: Gießform zur Herstellung eines Hydrogelfilms (ca. 40x25x1 mm).....33

Abb. 9: Direktbeschichtung von Wells.....33

Abb. 10: Reaktionsschema beim Zellviabilitätstest (WST-1).....36

Abb. 11: Kultivierung der primären OB für den WST-1-Assay mit PI.....37

Abb. 12: Kultivierung für das Mineralisationsassay.....39

Abb. 13: Reaktionsschema der ALP-Färbung mit BCIP/NBT.....40

Abb. 14: Ergebnisse der ALP-Färbung.....41

Abb. 15: Chemische Struktur von o-Kresolphthalein.....41

Abb. 16: Ca-Standardkurve zur Konzentrationsbestimmung (mM).....42

Abb. 17: Ergebnisse für den DS mittels Habeeb-Test.....57

Abb. 18: Methodenvergleich von ^{1}H-NMR und Habeeb-Test (DS).....58

Abb. 19: ^{1}H-NMR-Spektrum von Gelatine B.....59

Abb. 20: ^{1}H-NMR Spektrum von GelMA-1.....60

Abb. 21: ^{1}H-NMR Spektrum von GelMA-2.....61

Abb. 22: ^{1}H-NMR Spektrum von GelMA-3.....62

Abb. 23: ^{1}H-NMR Spektrum von GelMA-4.....63

Abb. 24: Direktbeschichtung von Wells.....64

Abb. 25: Gewebekultur-Deckglas mit einer Hydrogelbeschichtung.....66

Abb. 26: Ausgestanzte Hydrogelplättchen (Ø=7 mm, h=1 mm) 67

Abb. 27: Statistische Auswertung von GF und QF 69

Abb. 28: Statistische Auswertung des WST-1-Assays mit PI 74

Abb. 29: Statistische Auswertung des WST-1-Assays mit GelMA 75

Abb. 30: Färbung der OB mit aktiver ALP an den Tagen 1, 4 und 7 76

Abb. 31: BCIP/NBT-Färbung von ALP 77

Abb. 32: Scan der Hydrogele: Mineralisation 78

Abb. 33: Mikroskopische Detailaufnahmen: Mineralisation 79

Abb. 34: Kolorimetrisch nachgewiesenes Ca 80

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Signale und deren Zuordnung im ^{1}H-NMR-Spektrum. ..26

Tabelle 2: Legende für die Formeln zur quantitativen ^{1}H-NMR-Spektroskopie.....27

Tabelle 3: Eingesetzte Konzentrationen an Irgacure 2959 für die Herstellung von 10 % GelMA-Lösungen. 31

Tabelle 4: Übersicht über eingesetzte Volumina an 10 % GelMA-Lösung für die unterschiedlichen Beschichtungsarten. 32

Tabelle 5: Übersicht der Zelldichten bei der Aussaat für die jeweiligen Experimente. 38

Tabelle 6: Liste der verwendeten Reagenzien 49

Tabelle 7: Liste der verwendeten Materialien 50

Tabelle 8: Liste verwendeter Geräte 52

Tabelle 9: Ergebnisse der quantitativen ^{1}H-NMR-Spektroskopie 56

Tabelle 10: Ergebnisse der Bestimmung des Substitutionsgrades mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie und Habeeb-Test sowie deren Übereinstimmung.....58

Tabelle 11: Strategien zur Herstellung von Hydrogelen zur Kultivierung von primären OB in chronologischer Reihenfolge der erforderlichen Modifikationen. 65

Tabelle 12: Optimierung der Herstellungsmethode für runde Hydrogele in chronologischer Auflistung der Optimierungsmaßnahmen.....68

Tabelle 13: Charakterisierte mechanische Parameter: Gelfraktion (GF) und Quellungsfaktor (QF) der 10 % GelMA-Hydrogelel. 69

Tabelle 14: Methodenoptimierung der Aussaat von primären OB auf Deckglasbeschichtungen. Maßnahmen in chronologischer Reihenfolge mit Bewertung des Erfolges anhand Ausbildung eines konfluenten Zellrasens (+ positiv, - negativ). 70

Tabelle 15: Methodenoptimierung der Aussaat von primären OB auf Hydrogelbeschichtungen von Deckgläsern.....71

Tabelle 16: Ergebnisse der Zellviabilitätstests unter Einfluss des PI Irgacure 2959 mittels WST-1-Assay.....73

Tabelle 17: Ergebnisse der Zellviabilitätstest zur Abschätzung des Einflusses von GelMA.....75

Tabelle 18: Ca-Gehalt (mM), der anhand einer Standardkurve mit einem kolorimetrischen Ca-Assay ermittelt wurde.....80

Tabelle 19: Charakteristika der GelMA-Syntheseprodukte und der Hydrogele nach erfolgter Photopolymerisation.....81

9 Literaturverzeichnis

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung passiert sein, ersuche ich um Meldung bei mir.

Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society. 2001;10 Suppl 2:S96-101.

Alexander T, Nolte C, Krumlauf R. Hox genes and segmentation of the hindbrain and axial skeleton. Annual review of cell and developmental biology. 2009;25:431-56.

Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. Annals of the New York Academy of Sciences. 2007;1116:281-90.

Bonewald LF. The amazing osteocyte. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2011;26(2):229-38.

Bose S, Bandyopadhyay A. Introduction to Biomaterials. In: Bose S, Bandyopadhyay A, editors. Characterization of Biomaterials: Elsevier; 2013.

Brodbeck WG, Shive MS, Colton E, Nakayama Y, Matsuda T, Anderson JM. Influence of biomaterial surface chemistry on the apoptosis of adherent cells. Journal of biomedical materials research. 2001;55(4):661-8.

Campoccia D, Doherty P, Radice M, Brun P, Abatangelo G, Williams DF. Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. Biomaterials. 1998;19(23):2101-27.

Chatterjee K, Lin-Gibson S, Wallace WE, Parekh SH, Lee YJ, Cicerone MT, Young MF, Simon CG, Jr. The effect of 3D hydrogel scaffold modulus on osteoblast differentiation and mineralization revealed by combinatorial screening. Biomaterials. 2010;31(19):5051-62.

Chen J, Liu M, Chen W, Zhang N, Zhu S, Zhang S, Xiong Y. Synthesis, swelling and drug-release behaviour of a poly(N,N-diethylacrylamide-co-(2-dimethylamino) ethyl methacrylate) hydrogel. Journal of biomaterials science Polymer edition. 2011;22(8):1049-68.

Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. Clin J Am Soc Nephrol. 2008;3 Suppl 3:S131-9.

Das S, Pati F, Choi YJ, Rijal G, Shim JH, Kim SW, Ray AR, Cho DW, Ghosh S. Bioprintable, cell-laden silk fibroin-gelatin hydrogel supporting multilineage differentiation of stem cells for fabrication of three-dimensional tissue constructs. Acta biomaterialia. 2015;11:233-46.

Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. J Bone Miner Res. 1999;14(5):700-9.

Djabourov M, Lechaire JP, Gaill F. Structure and rheology of gelatin and collagen gels. Biorheology. 1993;30(3-4):191-205.

Drumheller PD, Hubbell JA. Densely crosslinked polymer networks of poly(ethylene glycol) in trimethylolpropane triacrylate for cell-adhesion-

resistant surfaces. Journal of biomedical materials research. 1995;29(2):207-15.
Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. Calcified tissue international. 1995;57(5):344-58.
Farris S, Song J, Huang Q. Alternative reaction mechanism for the cross-linking of gelatin with glutaraldehyde. Journal of agricultural and food chemistry. 2010;58(2):998-1003.
Ferreira P, Coelho JF, Gil MH. Development of a new photocrosslinkable biodegradable bioadhesive. International journal of pharmaceutics. 2008;352(1-2):172-81.
Fujisawa S, Atsumi T, Kadoma Y, Sakagami H. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. Toxicology. 2002;177(1):39-54.
Fukumoto S, Martin TJ. Bone as an endocrine organ. Trends in endocrinology and metabolism: TEM. 2009;20(5):230-6.
Gomes ME, Reis RL, Cunha AM, Blitterswijk CA, de Bruijn JD. Cytocompatibility and response of osteoblastic-like cells to starch-based polymers: effect of several additives and processing conditions. Biomaterials. 2001;22(13):1911-7.
Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. Analytical biochemistry. 2004;329(1):77-84.
Habeeb AF. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. Analytical biochemistry. 1966;14(3):328-36.
Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. Nature. 2003;423(6937):349-55.
Helmus MN, Gibbons DF, Cebon D. Biocompatibility: meeting a key functional requirement of next-generation medical devices. Toxicologic pathology. 2008;36(1):70-80.
Hill P. Bone remodelling. British Journal of Orthodontics. 1998;25:101-7.
Ifkovits JL, Burdick JA. Review: photopolymerizable and degradable biomaterials for tissue engineering applications. Tissue engineering. 2007;13(10):2369-85.
Imai Y, Youn MY, Inoue K, Takada I, Kouzmenko A, Kato S. Nuclear receptors in bone physiology and diseases. Physiological reviews. 2013;93(2):481-523.
Jung J, Oh J. Swelling characterization of photo-cross-linked gelatin methacrylate spherical microgels for bioencapsulation. e-Polymers. 2014;14(3).
Kang H, Shih YR, Hwang Y, Wen C, Rao V, Seo T, Varghese S. Mineralized gelatin methacrylate-based matrices induce osteogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells. Acta biomaterialia. 2014;10(12):4961-70.
Kim MS, Day CJ, Morrison NA. MCP-1 is induced by receptor activator of nuclear factor-{kappa}B ligand, promotes human osteoclast fusion, and rescues granulocyte macrophage colony-stimulating factor suppression of osteoclast formation. The Journal of biological chemistry. 2005;280(16):16163-9.
Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. Clinical Biochemistry. 2012;45(12):863-73.
Li Z, Kong K, Qi W. Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2006;343(2):345-50.

Lien S-M, Li W-T, Huang T-J. Genipin-crosslinked gelatin scaffolds for articular cartilage tissue engineering with a novel crosslinking method. Materials Science and Engineering: C. 2008;28(1):36-43.
Meikle MC. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. European journal of orthodontics. 2006;28(3):221-40.
Mironi-Harpaz I, Wang DY, Venkatraman S, Seliktar D. Photopolymerization of cell-encapsulating hydrogels: crosslinking efficiency versus cytotoxicity. Acta biomaterialia. 2012;8(5):1838-48.
Moe D, Kirkeby S. Evaluation of the indoxyl-tetrazolium method for measurement of alkaline phosphatase activity. Cellular and molecular biology. 1982;28(6):555-8.
Morin LG. Direct colorimetric determination of serum calcium with o-cresolphthalein complexon. American journal of clinical pathology. 1974;61(1):114-7.
Moursi AM, Winnard AV, Winnard PL, Lannutti JJ, Seghi RR. Enhanced osteoblast response to a polymethylmethacrylate-hydroxyapatite composite. Biomaterials. 2002;23(1):133-44.
Nakahama K. Cellular communications in bone homeostasis and repair. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2010;67(23):4001-9.
Nichol JW, Koshy ST, Bae H, Hwang CM, Yamanlar S, Khademhosseini A. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. Biomaterials. 2010;31(21):5536-44.
Ovsianikov A, Deiwick A, Van Vlierberghe S, Dubruel P, Möller L, Dräger G, Chichkov B. Laser Fabrication of Three-Dimensional CAD Scaffolds from Photosensitive Gelatin for Applicatin in Tissue Engineering. Biomacromolecules.
Ovsianikov A, Deiwick A, Van Vlierberghe S, Dubruel P, Moller L, Drager G, Chichkov B. Laser fabrication of three-dimensional CAD scaffolds from photosensitive gelatin for applications in tissue engineering. Biomacromolecules. 2011;12(4):851-8.
Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999;284(5411):143-7.
Ranjha NM. Swelling behaviour of pH-sensitive crosslinked poly(vinyl acetate co-acrylic acid) hydrogels for site specific drug delivery. Pakistan journal of pharmaceutical sciences. 1999;12(1):33-41.
Ratner BD. The engineering of biomaterials exhibiting recognition and specificity. Journal of molecular recognition : JMR. 1996;9(5-6):617-25.
Rungby J, Kassem M, Eriksen EF, Danscher G. The von Kossa reaction for calcium deposits: silver lactate staining increases sensitivity and reduces background. The Histochemical journal. 1993;25(6):446-51.
Shah. Adaptive growth factor delivery from a polyelectrolyte coating promotes synergistic bone tissue repair and reconstruction. PNAS. 2014.
Shin H, Zygourakis K, Farach-Carson MC, Yaszemski MJ, Mikos AG. Attachment, proliferation, and migration of marrow stromal osteoblasts cultured on biomimetic hydrogels modified with an osteopontin-derived peptide. Biomaterials. 2004;25(5):895-906.
Shrivats AR, McDermott MC, Hollinger JO. Bone tissue engineering: state of the union. Drug discovery today. 2014;19(6):781-6.
Sun H, Wu C, Dai K, Chang J, Tang T. Proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived stromal cells on akermanite-bioactive ceramics. Biomaterials. 2006;27(33):5651-7.

Sun T, Jackson S, Haycock JW, MacNeil S. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. Journal of biotechnology. 2006;122(3):372-81.
Teti A. Bone development: overview of bone cells and signaling. Current osteoporosis reports. 2011;9(4):264-73.
Van Den Bulcke AI, Bagdanov B, De Rooze N, Schacht EH, Cornelissen M, Berghmans H. Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels. Biomacromolecules. 2000(1):31-48.
Wang X, Schroder HC, Feng Q, Draenert F, Muller WE. The deep-sea natural products, biogenic polyphosphate (Bio-PolyP) and biogenic silica (Bio-Silica), as biomimetic scaffolds for bone tissue engineering: fabrication of a morphogenetically-active polymer. Marine drugs. 2013;11(3):718-46.
Wennberg C, Hessle L, Lundberg P, Mauro S, Narisawa S, Lerner UH, Millan JL. Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. J Bone Miner Res. 2000;15(10):1879-88.
Wiedmann-Al-Ahmad M, Gutwald R, Lauer G, Hubner U, Schmelzeisen R. How to optimize seeding and culturing of human osteoblast-like cells on various biomaterials. Biomaterials. 2002;23(16):3319-28.
Williams CG, Malik AN, Kim TK, Manson PN, Elisseeff JH. Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation. Biomaterials. 2005;26(11):1211-8.
Williams DF. Biomaterials and biocompatibility. Medical progress through technology. 1976;4(1-2):31-42.
Xiao. Ascorbic Acid-Dependent Activation of the Osteocalcin Promoter in MC3T3-E1 Preosteoblasts: Requirement for Collagen Matrix Synthesis and the Presence of an Intact OSE2 Sequence. 1997.
Xiao W, He J, Nichol JW, Wang L, Hutson CB, Wang B, Du Y, Fan H, Khademhosseini A. Synthesis and characterization of photocrosslinkable gelatin and silk fibroin interpenetrating polymer network hydrogels. Acta biomaterialia. 2011;7(6):2384-93.
Xing ZC, Han SJ, Shin YS, Koo TH, Moon S, Jeong Y, Kang IK. Enhanced osteoblast responses to poly(methyl methacrylate)/hydroxyapatite electrospun nanocomposites for bone tissue engineering. Journal of biomaterials science Polymer edition. 2013;24(1):61-76.
Yamamoto M, Ikada Y, Tabata Y. Controlled release of growth factors based on biodegradation of gelatin hydrogel. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. 2001;12(1):77-88.
Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004;19(12):2065-77.
Yu X, Tang X, Gohil SV, Laurencin CT. Biomaterials for Bone Regenerative Engineering. Advanced healthcare materials. 2015.
Zuo Y, Liu X, Wei D, Sun J, Xiao W, Zhao H, Guo L, Wei Q, Fan H, Zhang X. Photo-cross-linkable methacrylated gelatin and hydroxyapatite hybrid hydrogel for modularly engineering biomimetic osteon. ACS applied materials & interfaces. 2015;7(19):10386-94.
zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ. In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. Differentiation. 2003;71(1):18-27.

10 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Anna Wolfertsberger
Geboren am 12. Dezember 1988
Staatsangehörigkeit Österreich

Ausbildung

09/1995 – 06/1999	Volksschule Zeiselmauer, NÖ
09/1999 – 06/2007	Bundesgymnasium Tulln, NÖ
10/2007 – 03/2008	BOKU Wien, Lebensmittel- und Biotechnologie
03/2008 – 10/2015	Universität Wien, Diplomstudium Pharmazie

Berufserfahrung

10/2009 – 10/2010	Holmes Place, Rezeptionistin (20 h)
01/2011 – 04/2011	Stadt-Apotheke, Mag. Ulrike Urban, 3500 Klosterneuburg (12 h)
04/2011 – 05/2014	Apotheke Auge Gottes, Mag. Christina Kletter, 1090 Wien (20 h)
ab 07/2015	Apotheke zum Engel, Dr. Thomas Riedl, 3504 Krems-Stein (36 h)

Sprachen

Deutsch Muttersprache
Englisch fließend
Russisch Grundkenntnisse